ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

SCEAUX. — IMPRIMERIE E. CHARAIRE

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES

PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de

TOME TREIZIÈME
1899
AVEC NEUF PLANCHES

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

13me ANNÉE JANVIER 1899 N° 1

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LES MALADIES DES PLANTES

PAR M. EMILE LAURENT

Il serait évidemment souhaitable d'avoir, au sujet des maladies parasitaires des végétaux, des renseignements du même ordre que ceux que nous possédons au sujet des maladies de l'homme et des animaux : on verrait probablement reparaître, sur ce terrain nouveau de la lutte entre espèces végétales, les mêmes forces physico-chimiques que la physiologie animale nous montre en action. Malheureusement, jusqu'ici, les botanistes ont peu étudié les questions relatives à la virulence des parasites, à leurs procédés d'attaque des tissus vivants, aux moyens de défense des végétaux, aux toxines, aux antitoxines, aux vaccins.

Pourtant, on pouvait attendre beaucoup de recherches expérimentales entreprises sur le parasitisme chez les végétaux, dont l'alimentation peut être gouvernée avec beaucoup plus de précision que celle des animaux. Ils se laissent facilement soumettre à des essais variés, et, chez certaines espèces qui se perpétuent par voie asexuelle, on n'a pas à redouter les effets de la variation individuelle.

Ce n'est pas tout. Tout un groupe de questions, moins faciles à aborder dans l'étude des maladies animales, pouvaient

être élucidées par des recherches sur les parasites des plantes. Ce sont celles qui sont relatives aux relations entre la vie saprophyte et la vie parasite de beaucoup de champignons. Telles espèces, le *Botrytis cinerea* (*Peziza Fuckeliana*) en est un exemple excellent, vivent aux dépens des végétaux morts. Mais, dans certaines circonstances, on les voit devenir réellement parasites et provoquer de véritables épidémies parmi les plantes sauvages, et plus fréquemment encore parmi les plantes cultivées.

Ce sont là de beaux exemples de développement de la virulence, dont l'analyse paraît, *a priori*, plus simple que chez les parasites des animaux.

Voilà une série de questions que je m'étais proposé depuis longtemps d'aborder à l'aide d'expériences sur des plantes.

La plupart des maladies qui attaquent les végétaux supérieurs sont causées par des champignons dont le développement est relativement lent. Ils conviennent peu pour ce genre de recherches. Après divers essais tentés avec des moisissures diverses, je me suis décidé à utiliser deux bacilles qui s'étaient développés accidentellement sur des tubercules placés en atmosphère humide. Ils sont devenus rapidement des parasites virulents, qui convenaient à merveille aux recherches que j'avais en vue.

I

L'idée que la nature de l'alimentation donnée aux plantes influe sur leur résistance aux parasites n'est pas nouvelle.

Dès 1863, Liebig, dans un discours prononcé à l'Académie des Sciences de Munich, faisait remarquer que des pommes de terre, qui avaient été cultivées dans un champ où l'on avait répandu du phosphate de chaux et des sels de potasse, résistaient complètement à la maladie, tandis que des pommes de terre cultivées dans un sol fumé avec du terreau, et dans un autre avec du sulfate d'ammoniaque, furent la proie de la maladie.

Georges Ville a dû faire des observations analogues, car dans ses cours il insistait sur le rôle préservatif des sels de potasse contre les maladies de la vigne, particulièrement contre l'oïdium.

C'est un fait bien connu des agriculteurs qu'un excès d'engrais azotés favorise le développement de la rouille des céréales et du *Phytophthora* de la pomme de terre.

Ces relations entre l'alimentation minérale des plantes et l'intensité de leurs maladies cryptogamiques ont dû paraître peu compréhensibles aussi longtemps que la pathologie générale a été dominée par le rôle spécifique des parasites, et que l'on ignorait la notion de la variation de la virulence.

J'avais autrefois attiré l'attention sur les rapports qui paraissent exister entre la dispersion du Gui sur une même espèce d'arbre (peuplier, pommier) et la nature du sol[1]. En Belgique, ce parasite n'existe pas dans la zone sablonneuse septentrionale, mais est assez fréquent dans la région méridionale, là où le calcaire est beaucoup plus répandu. Des faits du même ordre se remarquent pour d'autres plantes parasites vasculaires (Cuscute, Orobanches). Il semble donc légitime de supposer que la nature du sol, c'est-à-dire l'alimentation minérale, exerce une influence indirecte sur le développement des parasites vasculaires.

De nombreux essais entrepris sur le Gui et plus récemment sur la Cuscute du Trèfle ne m'ont donné jusqu'ici que des résultats partiels, trop peu nombreux pour être publiés.

Dans une autre direction, la biologie d'un champignon parasite, le *Sclerotinia Libertiana*, a été étudiée avec beaucoup de soin par A. de Bary[2]. Parmi les résultats des recherches de ce botaniste éminent, il faut citer ici l'action toxique du contenu des crampons formés par le mycélium au contact des tissus sains des plantes ou des tubercules. On voit, avant la pénétration des filaments au travers des membranes cellulaires, le protoplasme se contracter, les cellules brunir, puis les tissus perdre leur turgescence. Les filaments mycéliens pénètrent alors dans les tissus ainsi désorganisés et s'y ramifient rapidement. Ils provoquent la destruction des lamelles mitoyennes, ce qui amollit les tissus et leur enlève finalement toute consistance.

De Bary s'est assuré que la contraction du protoplasme, le

1. Influence de la nature du sol sur la dispersion du gui (*Viscum album*). *Bull. de la Société royale de botanique de Belgique*, t. XXIX, p. 67, 1891.

2. Ueber einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten, *Botanische Zeitung*, 1886, n°s 22 à 27.

brunissement des cellules, leur désagrégation et le ramollissement des tissus peuvent être obtenus par l'immersion de coupes de tissus vivants dans le suc obtenu en pressant des carottes atteintes par le mycélium de *Sclerotinia*. Ce suc renferme une diastase digestive des lamelles mitoyennes, et de l'acide oxalique, qui peut se trouver à l'état d'oxalate acide de potassium. En milieu neutre, il n'y a aucune attaque de la cellulose.

Ce sont là d'importantes constatations au point de vue du mécanisme de l'action des parasites. Elles ont précédé les premiers travaux sur le rôle des toxines des microbes pathogènes des animaux, et ne semblent pas avoir attiré, comme elles le méritaient, l'attention des expérimentateurs.

Une autre observation fort intéressante fut faite par de Bary sur l'aptitude parasitaire, la virulence, si l'on veut, du *Sclerotinia*. Une spore qui germe dans l'eau pure ne peut attaquer une plante vivante. Lorsque les filaments germinatifs ont vécu pendant un certain temps en saprophytes aux dépens d'une plante morte ou de milieux nutritifs appropriés, ils deviennent capables d'envahir les tissus vivants.

II

PREMIÈRES EXPÉRIENCES

Presque tous les matériaux qui ont servi aux expériences que je vais exposer ont été fournis par un champ d'essais fait en 1897 : je me proposais d'y étudier l'influence de l'alimentation minérale sur la descendance de quelques plantes cultivées. J'étais parti de cette idée que des doses extraordinaires d'engrais minéraux, introduites dans le sol, doivent réagir directement sur les appareils végétatifs, puis sur les graines. Les résultats de ces recherches seront publiés dans quelques années.

Le champ d'expériences a été établi dans une bonne terre de jardin, de nature argileuse et contenant :

Matière organique	54.40 0/00
Azote total	1.70
Chaux	15.60
Potasse	0.96
Acide phosphorique	3.03

On a tracé quatre parcelles d'égale superficie et de même

fertilité initiale : on y a répandu les engrais suivants, dont les doses sont calculées pour un hectare :

Parcelle I (P. I) : 1,100 kg. de sulfate d'ammoniaque.

Parcelle II (P. II) : 2,200 kg. de kaïnite à 13 0/0 de potasse anhydre.

Parcelle III (P. III) : 2,200 kg. de superphosphate de chaux à 15 0/0 d'acide phosphorique anhydre.

Parcelle IV (P. IV) : 15,500 kg. de chaux grasse.

Dans chacune des parcelles, on a mis en culture, au commencement d'avril, des pommes de terre, variété Simson, des graines de carottes, variété nantaise, et d'autres espèces. Les tubercules, récoltés en octobre, ont été mis en expérience au mois de février suivant. Sur des pommes de terre coupées en deux et des rondelles de carottes, provenant des quatre parcelles et placées sous cloche humide, on a semé des conidies de *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de bière gélatinisé. Cette moisissure ne s'est pas développée sur les tubercules ; mais, sur une rondelle provenant de la P. IV, il se forma une petite colonie bactérienne de consistance glaireuse. C'était un bacille court, introduit sans doute au moment du semis de *Botrytis*. Aussitôt, je renonçai à cette dernière espèce, afin de diriger tous mes efforts sur le bacille ainsi découvert.

Des parcelles de la petite colonie furent inoculées avec un scalpel flambé aux rondelles de P. IV qui avaient résisté premièrement à l'infection, puis à des racines des P. I, II, III; le tout fut comme précédemment abandonné à la température du laboratoire.

Quatre jours plus tard, toutes les rondelles des P. II et IV étaient infectées par la matière visqueuse des colonies du microbe, mais les rondelles des P. I et III restaient intactes.

A deux reprises, on réinocula ces dernières sans en provoquer l'infection.

L'expérience fut répétée avec des carottes provenant des quatre parcelles, infectées avec le microbe obtenu dans la première série sur les rondelles de P. IV. Les résultats furent les mêmes ; les rondelles de P. II et IV furent rapidement attaquées et ramollies à la température ordinaire ; celles des P. I et III étaient toujours saines.

Une nouvelle série, faite avec des rondelles de racines des

quatre parcelles, mais en prenant la semence sur celle de P. II de la deuxième série, donna un développement général sur les tubercules des P. I, II et IV et à peine quelques colonies sur les rondelles de P. III.

Enfin une quatrième série, dont les rondelles de la P. I de la troisième série ont donné la semence, a donné un développement sur toutes les rondelles des quatre parcelles.

Le microbe était donc devenu parasite pour les carottes des quatre parcelles. Après trois passages sur les tubercules moins résistants, les plus rebelles à l'infection, ceux qui avaient dû absorber plus de phosphates que les premiers, ne pouvaient plus résister à l'invasion microbienne.

Telle la bactéridie charbonneuse qui, dans les expériences de Pasteur, Chamberland et Roux, avait perdu sa virulence en culture artificielle et la recouvrait lorsqu'on la faisait passer successivement sur des animaux d'abord très jeunes, puis de plus en plus âgés et résistants.

Des résultats, absolument comparables, ont été obtenus sur des tubercules de pomme de terre cultivés dans le champ d'expériences, à côté des carottes.

Au début, j'avais essayé d'inoculer les tubercules en y creusant une cavité à l'aide d'un perce-bouchon flambé, puis en y introduisant un peu de matière visqueuse prise sur les rondelles de carottes.

Lorsque le microbe se développait, il envahissait les tissus des tubercules et à la longue les transformait en une pulpe formée des cellules dissociées, mais dans lesquelles persistaient les grains d'amidon. Autour des cellules et finalement dans les cellules, pullulaient des bacilles cylindriques, colorables en jaune par l'iode.

Par la suite, j'ai préféré remplacer ce procédé d'inoculation par un autre beaucoup plus simple. Après lavage, les tubercules sont coupés en deux avec un couteau flambé, et sur les sections on étend la matière visqueuse du microbe au moyen d'un scalpel passé également dans la flamme.

Les tubercules, ainsi ensemencés, sont placés sous cloche maintenue humide avec un peu d'eau stérilisée. Le plus souvent, j'employais de grands cristallisoirs à couvercle.

Au mois de mars 1898, des tubercules de pomme de terre

récoltés dans chacune des parcelles ont été inoculés avec le microbe provenant du troisième passage sur les carottes de la P. IV, et ensuite placés à l'étuve à 25°.

Ce sont encore les tubercules de la P. IV qui furent les premiers attaqués : le quatrième jour, ils étaient recouverts superficiellement d'une couche visqueuse épaisse de 4 à 5 millimètres, formée de cellules dissociées et répandant une odeur putride, fécaloïde.

Quant aux tubercules des P. I, II et III, ils ne présentaient aucune altération.

L'expérience a été répétée, d'abord en rafraîchissant les sections des tubercules des P. I, II et III non attaqués dans l'essai précédent, puis sur d'autres tubercules provenant des quatre parcelles. La semence était prise sur les tubercules de la P. IV qui venaient d'être atteints. Les tubercules furent encore placés à 25°. De nouveau, le développement du microbe fut très rapide sur les tubercules de la P. IV ; au bout de 12 heures, il y avait déjà une couche visqueuse bien apparente. Par contre, les tubercules de P. I n'étaient que faiblement attaqués et ceux des P. II et III étaient tout à fait intacts.

Le troisième jour, la couche visqueuse des tubercules de P. IV avait de 3 à 4^{mm} d'épaisseur; la maladie s'était aussi développée sur les tubercules de P. I, et, sur ceux des P. II et III, il y avait çà et là quelques colonies visqueuses.

Au cinquième jour, les tubercules des P. I, II et III étaient complètement cicatrisés par suite de l'arrêt du développement du microbe, et leur surface était devenue blanche à la suite de la dessiccation des cellules à amidon.

Seuls les tubercules de la P. IV continuaient à pourrir de plus en plus profondément.

Une troisième expérience a été faite à 25° en employant comme semence les zooglées produites sur les tubercules de la P. IV du 2e passage.

Après 12 heures, le développement est bien visible sur les tubercules des P. I, III et IV, et est nul sur ceux de la P. II. Il n'y a plus de cicatrisation ultérieure sur les premiers.

Enfin la matière visqueuse du 3e passage, inoculée sur des tubercules de la P. II, a provoqué l'altération de ces tubercules.

Les tubercules de la P. II. les plus résistants des quatre parcelles, ne pouvaient donc se défendre contre la virulence exaltée par quatre passages successifs sur des tubercules de la P. IV, les plus sensibles à l'infection microbienne.

Le microbe qui a donné lieu à ces expériences a été isolé sur moût de bière et bouillon gélatinisés. Il n'est autre que le *Bacillus fluorescens putidus*, dont les belles colonies et la fluorescence remarquable sont si caractéristiques sur bouillon gélatinisé légèrement alcalin.

Le bacille a été cultivé en solution minérale additionnée de diverses matières organiques.

Voici la composition de cette solution :

Eau	1000 c. c.
Phosphate neutre d'ammoniaque.	2.5 gr.
— neutre de potassium ..	2.5 —
Sulfate de magnésium...........	1.0 —

On y ajoutait 1 0/0 de :

Saccharose,
Lactose,
Glycose,
Mannite,
Glycérine.
Peptone,
Asparagine,
Succinate de potassium,
Lactate —
Citrate —
Tartrate —
Bimalate d'ammoniaque.
Butyrate de sodium.
Hippurate de —
Formiate de —
Acétate de potassium.

Les trois derniers corps seuls n'ont pas été assimilés par le bacille.

Les cultures faites en solutions de sucres, de glycérine, de peptone et d'asparagine, très vigoureuses, inoculées à la surface des tubercules de la P. IV, ne se sont plus développées.

Le microbe avait perdu sa virulence.

Nous aurons l'occasion de revenir sur ce point.

III

NOUVEAUX ESSAIS D'INOCULATION

Les derniers résultats que je viens d'exposer datent des premiers jours d'avril de cette année. Je résolus de les compléter par des expériences nouvelles et plus variées.

Les quatre parcelles du champ d'expériences ont reçu, à la fin de mars et au moment du labour, les engrais suivants : les doses sont calculées par hectare :

P. I : 500 kg. de nitrate de soude et 800 kg. de sultate d'ammoniaque.

P. II : 2,000 kg. de kaïnite dosant 13 °/₀ de potasse.

P. III : 2.000 kg. de superphosphate de chaux dosant 15 °/₀ d'acide phosphorique.

P. IV : 40,000 kg. de chaux grasse.

Une 5ᵉ parcelle fut établie et reçut une dose de 2.750 kg. de chlorure de sodium par hectare. Elle devait renseigner sur les effets qu'il fallait attribuer à l'action osmotique de sels solubles employés en si grande quantité. Elle permit, par la suite, d'apprécier l'action nuisible du chlorure de sodium sur certains parasites des plantes cultivées.

Au lieu de me borner, comme en 1897, à des essais sur une seule variété de pomme de terre, j'en ai choisi huit; la plupart provenaient de la maison Vilmorin. Les voici : Marjolin, Chave, Early rose, Pousse debout, Chardon, Simson, Blanchard et de Zélande [1].

Parmi ces variétés, les unes : Marjolin, Early rose, Blanchard sont réputées comme peu résistantes à la maladie ou plus exactement aux divers organismes qui font pourrir les tubercules [2]. Au contraire, Chave, Simson et surtout Chardon

1. Cette dernière variété a été identifiée par M. H. de Vilmorin, à qui je suis heureux d'exprimer ici mes remerciements.

2. Divers organismes déterminent la pourriture des tubercules de pomme de terre. M. Wehmer (Untersuchungen über Kartoffelkrankheiten, III, *Centralblatt für Bakteriologie*, Zweite Abteilung, t. IV, nᵒˢ 13 à 21, 1898) a décrit plusieurs Bactéries, parmi lesquelles le *B. Amylobacter*, inoculé autrefois par M. Van Tieghem à des tubercules sains (*Bull. de la Soc. bot. de France*, 1884).

Tout récemment B. Frank (Untersuchungen über die verschiedenen Erreger der Kartoffelfaûle, *Ber. der deutsch. bot. Ges.*, 1898, p. 282), attribue la pourriture de la pomme de terre à diverses moisissures, Bactéries, et aussi à des Nématodes, isolés ou associés.

sont peu exposées à la maladie (*Phytophthora*) et à la pourriture.

Dans une sixième parcelle, dont il sera peu question dans ces recherches, les variétés de pomme de terre indiquées étaient cultivées sans engrais spéciaux; nous savons par l'analyse faite en 1897 que la terre est suffisamment fertile. Les tubercules qui y ont été récoltés sont considérés comme normaux, tandis que ceux des autres parcelles avaient dû être influencés par des doses de composés chimiques beaucoup plus fortes que celles qui sont employées d'ordinaire dans les cultures.

Les tubercules de la variété Simson plantés en 1898 avaient été récoltés dans les parcelles correspondantes l'année précédente. A l'influence actuelle des engrais, s'ajoutait donc, pour cette variété, celle qui peut se transmettre par hérédité des caractères acquis. Cette influence est évidente chez les plantes qui se reproduisent par procédé asexuel, particulièrement chez la pomme de terre.

La plantation fut faite avec tous les soins que réclament de tels essais : les conditions de culture étaient bien identiques dans toutes les parcelles, à l'exception, évidemment, des engrais employés.

Cette année on a aussi cultivé dans le même champ d'essais : carotte nantaise, chicorée witloof (à grosse racine), topinambour, et une variété locale de betterave à sucre que je sélectionne depuis quelques années. Ces plantes tuberculeuses ont donné lieu à un petit nombre de recherches, afin de contrôler les résultats nombreux obtenus sur la pomme de terre.

La levée des plantes ne donna lieu à aucune observation spéciale, sauf dans la parcelle V, où le sel a nettement contrarié la germination des graines, mais n'a pas eu d'action bien nuisible sur la pomme de terre. Tous les tubercules employés comme semence ont germé et se sont développés très régulièrement.

Nous savons que le *Bacillus fluorescens putidus*, cultivé dans les milieux liquides, avait perdu toute aptitude à se développer sur les tubercules vivants. Il aurait fallu le conserver actif par des passages successifs sur pomme de terre. Cette précaution fut oubliée, et quand, dans la dernière quinzaine de juin, je voulus reprendre mes essais d'inoculation, j'étais dépourvu de semence virulente pour la pomme de terre.

L'idée me vint de recourir au même procédé qui, au commencement de l'année, m'avait donné accidentellement un bacille parasite de la même espèce. De jeunes tubercules, très aqueux, de la variété Marjolin, furent pris dans chacune des cinq parcelles, coupés en deux, et les surfaces de section exposées pendant un quart d'heure à l'air du laboratoire; les tubercules furent ensuite mis sous cloche humide à l'étuve à 30°.

Seuls, les tubercules de la P. IV se laissèrent entamer par des colonies visqueuses, parmi lesquelles une fut choisie comme souche de mes nouvelles cultures. Elle était formée par un bacille mobile, long de 2 à 5 μ, large de 0,5 à 0,6 μ. La culture sur milieux gélatinisés montra que ce n'était plus le *B. fluorescens putidus*, mais un autre bacille non fluorescent et dont les colonies rappellent étroitement celles du *Bacillus coli communis* : dans la profondeur, ce sont de petits disques jaunâtres, tandis qu'à la surface les colonies d'un blanc nacré sont étalées et ont leur bord circulaire, parfois sinueux.

Les propriétés physiologiques de ce microbe seront exposées plus loin, après la description des résultats qu'ont donnés les inoculations faites sur les diverses variétés de pomme de terre.

La récolte des tubercules des cinq parcelles fut faite le 20 juillet pour les variétés hâtives et le 20 septembre pour les variétés tardives; on classa avec soin le produit de chaque variété dans chacune des parcelles.

Les diverses variétés ont donné des rendements très différents dans les parcelles. Ainsi Marjolin a donné dans la P. I le double de ce qu'a produit chacune des quatre autres parcelles: pour Chave, le maximum de récolte était dans la P. IV; pour Chardon, dans la P. III. Chaque variété semble donc avoir ses exigences propres en ce qui concerne les engrais minéraux. C'est là une influence spéciale que beaucoup d'agronomes sont portés à oublier dans leurs essais sur les plantes cultivées.

Le 31 juillet, je choisis trois tubercules de Marjolin dans la récolte de chacune des cinq parcelles; on les coupe en deux et on les place dans les cristallisoirs à couvercle. Sur chaque moitié, on inocule le bacille cultivé sur tubercules de la même variété récoltés dans la P. IV. Toutes les cultures furent mises à l'étuve à 30°, à 6 heures du soir.

A minuit, une couche gluante, crémeuse, recouvrait tous

les tubercules. mais elle était bien plus épaisse sur ceux de la P. IV. Le lendemain matin, à 8 heures, les différences sont plus nettes : le développement du microbe tend à s'arrêter sur les tubercules des P. I, II et V, et il continue sur les tubercules des P. III et IV. A midi, la surface des premiers est cicatrisée, desséchée, à peine creusée çà et là, à l'endroit des colonies microbiennes. Les sections des tubercules des P. III et IV sont de plus en plus profondément atteintes. Le lendemain, les tubercules de P. III sont cicatrisés. et la maladie continue à pénétrer de plus en plus profondément dans les tissus des tubercules de P. IV. Une coupe perpendiculaire à la section montre une couche glaireuse épaisse de 10 à 12 mm. après le quatrième jour; en dessous, on voit une zone plus claire. mais qui, cependant, est déjà atteinte tout au moins par des produits de sécrétion de la couche infectée.

Cette première expérience montre que, chez la pomme de terre Marjolin. la chaux répandue en abondance sur le sol prédispose à la pourriture bactérienne. C'est la confirmation des résultats obtenus précédemment avec la variété Simson.

Des tubercules d'Early rose provenant des cinq parcelles ont été aussi inoculés avec de la semence prise sur des tubercules de P. IV de l'expérience précédente. Après 6 heures à l'étuve à 30°, toutes les moitiés de tubercules étaient recouvertes d'une couche glaireuse, qui, 24 heures après l'inoculation, avait partout une épaisseur de 4 à 5 mm. sauf sur les tubercules de la P. V. Bien que deux passages consécutifs sur tubercules de Marjolin de la P. IV aient dû développer la virulence, il est évident que la variété Early rose offre peu de résistance à la pourriture bactérienne. C'est un fait qui fut, du reste, vérifié à maintes reprises.

Il convient de remarquer que le chlorure de sodium, répandu sur le sol, avait augmenté un peu la résistance de cette variété.

Dans les essais suivants, plusieurs variétés ont été inoculées en même temps. En voici les résultats généraux :

La variété Blanchard est, comme Early rose, très sensible à la maladie bactérienne : les tubercules des 5 parcelles ont été très fortements atteints.

Pousse debout est très résistante ; même les tubercules de P. IV étaient complètement cicatrisés au bout de 40 heures.

Le microbe les avait d'abord entamés, mais ne s'était pas développé ailleurs.

Des tubercules de Chave, ceux de P. I. et IV ont été les plus attaqués, et ceux de P. V les moins atteints.

Quant à Chardon, ses tubercules provenant de la P. IV ont été fortement endommagés ; ceux des P. I et II peu, et ceux de la P. III sont restés indemnes. Cette variété n'avait pas été plantée dans la parcelle V, faute de tubercules assez nombreux lors de la plantation.

L'influence de la chaux est encore ici nettement manifeste : les variétés Chave et Chardon ont été nettement atteintes : Pousse debout était moins résistante, au point de permettre la production de zooglées, il est vrai bientôt cicatrisées.

L'acide phosphorique de la P. III a augmenté la résistance de Chardon ; la résistance de Chave est diminuée par les engrais azotés : le chlorure de sodium a eu sur les tubercules de cette variété, comme sur ceux d'Early rose, une action favorable. Ce sel ne paraît pas avoir eu d'effet sensible sur la variété Blanchard, celle qui, dans tous ces essais, a été la moins réfractaire à la maladie bactérienne.

Les tubercules des P. I et IV de toutes les variétés ont présenté, à la limite des tissus atteints et des tissus encore sains, une zone noire, visible à la surface autour des zooglées, et en profondeur sur une section perpendiculaire. Cette coloration n'a jamais été remarquée ailleurs, ce qui me fait supposer qu'elle était due à un produit azoté formé par le microbe aux dépens des tissus. La chaux a naturellement activé les phénomènes de nitrification, et provoqué une absorption plus abondante de nitrates par les tubercules.

Les expériences précédentes étaient faites à la température de 30°. Celle qui va suivre a eu lieu à la température du laboratoire, au mois d'août (20-22°). Des tubercules de Chave, Marjolin, Blanchard, Early rose et Chardon, provenant des cinq parcelles, ont été inoculés avec de la semence prise sur un tubercule de Blanchard, complètement pourri.

Les résultats différaient peu de ceux donnés par les mêmes essais à 30°. Tous les tubercules récoltés dans la parcelle IV ont été attaqués avec rapidité.

Les tubercules de Marjolin, Early rose et Blanchard des

5 parcelles ont été rapidement infectés, tellement leur résistance est faible devant l'action du microbe devenu plus virulent par suite du passage sur les tubercules de Blanchard.

Chardon des P. I, II et III a parfaitement résisté. Chave des P. I, II. III et V a d'abord été envahi par le microbe, mais les tubercules étaient cicatrisés à la fin du 3e jour.

Parmi les variétés de pomme de terre étudiées, il y en a qui sont très exposées à contracter par inoculation la pourriture bactérienne : c'est Marjolin, Early rose et Blanchard ; Chave n'est pas complètement rebelle et Chardon offre, après Pousse-debout, le maximum de résistance.

Comme la récolte de cette dernière variété était peu importante et les tubercules petits, c'est Chardon qui a été adoptée par la suite pour les essais où l'on se proposait de diminuer la résistance. Dans les expériences faites dans la direction opposée, en vue d'accroître la résistance, on se servait surtout de la variété Early rose et parfois de Blanchard.

Lors des recherches faites sur les tubercules de carotte et pomme de terre (Simson) de la récolte de 1897, on avait observé une augmentation progressive de la virulence par des passages successifs sur des produits de la parcelle IV.

Des observations analogues ont été faites avec la variété Chave. Après deux passages sur tubercules des P. IV, le microbe devenait capable d'envahir les tubercules des P. I et II ; après trois passages, ceux des P. III et V étaient aussi atteints.

Une expérience faite le 12 août, à la température ordinaire, comprenait des tubercules coupés en deux des variétés de pomme de terre Simson et Chardon, des rondelles de chicorée à grosse racine et de carotte nantaise. Il y avait des échantillons de chaque variété pris dans les 5 parcelles. La semence provenait d'un 3e passage sur Early rose, et était donc assez virulente.

La variété Simson s'est montrée beaucoup moins résistante au microbe actuel que lors des inoculations avec le *Bacillus fluorescens putidus* : aucun tubercule n'a échappé à l'infection, même ceux qui provenaient d'un champ où les conditions de culture étaient normales. Sauf les tubercules de la P. IV, la variété Chardon n'a pas été atteinte, mais sur les surfaces de section s'est développée une moisissure (*Botrytis?*), dont le développement

trop lent n'a pas permis de faire des essais analogues à ceux dont le bacille a été l'objet.

Quant aux rondelles de chicorée et de carotte inoculées avec le microbe virulent pris sur pomme de terre, celles qui provenaient de P. IV ont été complètement atteintes ; les carottes de P. I et P. II ont beaucoup souffert. Les carottes de P. V et principalement de P. III, et les chicorées de P. I, de P. V, et surtout de P. III ont le mieux résisté.

L'influence des engrais azotés sur la pourriture bactérienne a été mise de nouveau en évidence par des inoculations faites à des tubercules de Marjolin. provenant d'un champ d'essais sur l'action comparée des engrais chimiques et du fumier de ferme. Ceux-ci avaient été employés à très fortes doses : 800 kg. de sulfate d'ammoniaque, autant de superphosphate, 400 kg. de kaïnite et de sulfate de chaux d'un côté ; 80,000 kg. de fumier de l'autre. Tout près, il y avait une parcelle où l'on s'est abstenu d'enfouir un engrais quelconque.

Inoculés avec une race virulente du bacille, les tubercules récoltés dans la parcelle avec engrais chimiques, mis à l'étuve à 35°, ont pourri complètement en l'espace de cinq jours. Tout le parenchyme était devenu pulpeux, et seule l'écorce était restée intacte.

Les tubercules cultivés avec fumier abondant ont pourri, mais moins rapidement que les précédents ; au cinquième jour, il y avait encore une couche assez épaisse de parenchyme sain.

Enfin les tubercules, qui n'avaient pas subi l'influence d'un engrais récent, avaient beaucoup mieux résisté à la pourriture que tous les autres.

L'engrais, en permettant une absorption exagérée de combinaisons azotées, avait donc favorisé l'invasion microbienne.

D'une manière générale, la chaux diminue la résistance à la pourriture bactérienne de la pomme de terre, de la carotte et de la chicorée. Les engrais azotés et potassiques ont des effets analogues, mais moins accentués. Au contraire, les phosphates accroissent la résistance chez la pomme de terre, la carotte et la chicorée, et il en est de même, mais à un moindre degré, du chlorure de sodium.

IV

EXPÉRIENCES SUR LES MOYENS DE DÉFENSE DE LA POMME DE TERRE A L'INVASION MICROBIENNE

Une même variété de pomme de terre oppose aux microbes une résistance qui varie avec la nature de l'engrais employé ; d'autre part, il est des variétés qui sont très sujettes à la pourriture bactérienne, tandis que d'autres sont douées d'une sorte d'immunité plus ou moins complète. Comment convient-il d'interpréter ces propriétés ? Il ne peut être question chez les plantes supérieures de phénomènes comparables à ceux dont les phagocytes des animaux sont les merveilleux instruments. Le protoplasme ne paraît pas avoir été l'objet d'une telle spécialisation chez les plantes vasculaires. Dès lors, il faut s'attendre à l'intervention directe de produits solubles sécrétés par les cellules vivantes : nous savons, du reste, que beaucoup de plantes supérieures ont recours à des procédés analogues pour se défendre contre les animaux herbivores (production d'alcaloïdes, de substances âcres dans les tissus les plus exposés).

La diminution de résistance occasionnée par la culture de la pomme de terre, de la carotte et de la chicorée, dans les parcelles qui avaient reçu de fortes doses de chaux et de potasse, permettait de croire, *a priori*, qu'il y a intervention de modifications dans l'acidité du suc cellulaire. Cette opinion était d'autant plus légitime que l'addition de phosphate au sol accroît la résistance des mêmes plantes. On sait, en effet, que les phosphates sont l'objet d'une absorption importante, et qu'ils donnent facilement naissance à des sels acides qui se dissolvent dans le suc cellulaire.

Dans une première série d'essais, on a voulu s'assurer si diverses solutions salines avaient une action directe sur la résistance des tubercules aux microbes.

Des tubercules coupés en deux, des variétés Chave et Chardon récoltées dans la **P. III**, que nous savons très résistants, ont été immergés pendant cinq heures dans des solutions dans l'eau distillée de :

Sulfate de potassium à....................	2 0/00
— de calcium........................	1 0/00
— d'ammoniaque	2 0/00
Asparagine..............................	2 0/00

On a attribué aux substances amidées, produites en plus grande abondance dans les terrains richement pourvus d'engrais azotés, un rôle dans la propagation de certains champignons parasites des plantes, et particulièrement du *Phytophthora* de la pomme de terre.

En même temps qu'on plongeait des tubercules dans les solutions précitées, on immergeait des tubercules coupés aussi en deux, des variétés Early rose et Marjolin récoltées dans la P. IV, dans les solutions :

Phosphate neutre de sodium à............	2 0/00
— neutre de potassium à..........	2 0/00
— neutre d'ammoniaque à.........	2 0/00

Tous les tubercules furent inoculés avec le bacille de 4e passage sur Early rose et mis à l'étuve à 35°.

Les premiers (Chave et Chardon) sont restés intacts; les seconds (Early rose et Marjolin) ont été attaqués.

Les solutions salines n'avaient donc pu, par leur action directe, modifier la résistance naturelle des quatre variétés qui avaient servi à l'expérience.

Des tubercules de Marjolin et Blanchard coupés en deux furent plongés pendant 40 heures dans une solution de phosphate acide de potassium à 1 0/00, puis retirés et inoculés sans rafraîchir les plaies. Après 15 heures de séjour à l'étuve à 30°, ils étaient fortement attaqués.

Dans des tubercules des mêmes variétés, on a creusé avec un emporte-pièce des cavités que l'on a remplies de la solution de phosphate acide de potassium : 40 heures après, on a coupé les tubercules en deux par une section tantôt parallèle tantôt perpendiculaire aux cavités, et on a inoculé les sections. Même au voisinage immédiat des tissus qui avaient été en contact avec la solution saline, le développement du microbe a été très actif.

Le rôle des matières minérales ne peut donc s'expliquer que par l'intervention de phénomènes d'assimilation : il se produit

des substances qui réagissent, soit en modifiant l'acidité du suc cellulaire, soit par un autre mécanisme.

Les expériences qui vont suivre permettent d'attribuer une grande importance aux variations de l'acidité cellulaire.

Des tubercules de Chave et Chardon provenant de la P. III sont immergés pendant 3 heures dans :

Eau de chaux,
Potasse à 1 0/00,
Soude à 1 0/00.

En même temps, on plonge des tubercules coupés en deux d'Early rose et Marjolin récoltés dans la P. I dans des solutions d'acide tartrique, citrique et lactique à 1 0/00.

Les tubercules, retirés des solutions, ont été inoculés avec le bacille du 5e passage sur Early rose.

Après douze heures de séjour à l'étuve à 35°, tous les tubercules indistinctement étaient atteints.

Les solutions alcalines avaient fait disparaître l'immunité des variétés Chave et Chardon, et les solutions acides, à 1 0/00, n'avaient eu aucune action favorable à la résistance des variétés Early rose et Marjolin.

Les doses d'acides organiques ont été augmentées ; les essais ont alors donné des résultats conformes aux prévisions.

Des tubercules coupés en deux de Marjolin, Early rose, Blanchard, Simson, toutes variétés très peu résistantes, plongés pendant 4 heures dans des solutions :

Acide oxalique à	0.5 0/0
— formique à	0.5 0/0
— acétique à	1 0/0
— tartrique à	2 0/0
— lactique à	2 0/0
— citrique à	5 0/0

puis inoculés et mis à l'étuve sont restés inaltérables. Le microbe ne parvenait plus à pénétrer dans les tissus dont on avait artificiellement accru l'acidité.

La réaction plus ou moins acide du suc cellulaire joue ici un rôle vraiment prépondérant, et se comprendra sans difficultés lorsque nous connaîtrons les procédés employés par le microbe pour s'introduire dans les tissus vivants. Il y a ici intervention d'une diastase qui dissout les lamelles mitoyennes des cellules et

qui, chez la pomme de terre, n'a d'action que dans un milieu à réaction alcaline ou légèrement acide.

L'influence de l'acidité du suc cellulaire a été confirmée par un grand nombre d'essais qu'il est inutile d'exposer en détail. Ainsi, des tubercules de deux variétés éminemment résistantes à la pourriture bactérienne, Préciosa et de Zélande, plongés pendant 2 heures dans une solution de potasse à 1 0/00, perdent leur immunité, même quand on les inocule avec une race de bacille peu virulente. C'est ce qui m'a conduit à découvrir un procédé très simple pour rendre la virulence au bacille lorsque, pour une raison quelconque, il n'est plus capable de se développer sur des tubercules vivants : une heure d'immersion des tubercules dans une solution à 1 0/00, ou même moins, diminuait la résistance et assurait le développement du microbe jusqu'aux tissus les plus profonds.

De prime abord, on pourrait conclure des expériences précédentes que l'immunité de certaines variétés est provoquée par une plus grande acidité du suc cellulaire, tandis que, chez d'autres, la faible résistance résulte d'une acidité moindre. Pour s'en assurer, des tubercules de diverses variétés, cultivées, les unes dans les parcelles du champ d'expériences, les autres ailleurs, ont été soumises à une pression de 300 atmosphères de manière à en exprimer rapidement le jus.

On a ainsi pressé des variétés très résistantes (Préciosa, de Zélande, Chave), d'autres très peu résistantes (Early rose, Marjolin, Blanchard, Simson), ou de résistance moyenne (César, Boule d'Or). Les tubercules de ces deux dernières variétés et ceux de Préciosa provenaient d'un champ différent du champ d'expériences.

L'acidité a été mesurée avec la phénolphtaléine, et l'opération était faite très rapidement pour éviter des modifications provoquées au bout de peu de temps par les phénomènes d'oxydation dus aux oxydases.

Voici les chiffres obtenus pour 100 c. c. de jus ; l'acidité est évaluée en milligrammes d'acide sulfurique :

Préciosa	231.1
De Zélande	289.0
Chave de la P. I	329.3
— — II	242.7

Chave de la P. III	329.3
— — IV	416.0
— — V	300.4
— — VI (sans engrais)	375.6
Marjolin	271.6
Early rose	387.1
Blanchard	317.8
Simson de la P. I	398.8
— — II	248.5
— — III	393.0
— — IV	340.9
— — V	213.8
César	300.5
Boule-d'Or	364.1

L'examen de ces chiffres montre qu'il n'y a aucune relation entre l'acidité *totale* du jus des tubercules des diverses variétés et leur résistance à l'action des microbes.

Préciosa et de Zélande, tout à fait rebelles, ont une acidité exprimée par 231.1 et 289.0; Blanchard et Early rose, que nous savons fort peu résistantes, ont une acidité représentée par 317.8 et 387.1.

Bien plus, pour Chave, les tubercules provenant de la P. IV ont une acidité égale à 416.0 mg. de SO^4H^2, et ceux de la P. III n'ont qu'une acidité de 329.3 mg. Or, ceux-ci, à l'état normal, ne sont jamais attaqués, tandis que ceux-là sont un excellent milieu de culture pour le microbe.

Il est donc évident que l'acidité totale ne nous fournit aucune indication sur le mécanisme de l'immunité de certaines variétés de pomme de terre à la pourriture bactérienne.

Mais on a le droit de supposer que la substance active, qui sert à la défense des cellules vivantes, se trouve à l'état soluble dans le suc cellulaire. Dès lors, on peut avoir quelque chance de mettre son action en évidence par des essais analogues à ceux que l'on a faits avec les divers sérums des animaux. Le jus d'une variété très résistante aura-t-il une influence protectrice sur les tubercules d'une autre variété de moindre résistance?

Le plus grand obstacle à des essais de ce genre est la rapidité avec laquelle les jus de pomme de terre s'oxydent et noircissent au contact de l'air : il en résulte des modifications qui, sans doute, ne permettent pas de comparer leurs effets *in vitro* à ceux qu'ils peuvent avoir dans les cellules vivantes.

Quoi qu'il en soit, je signale les résultats suivants.

Des tubercules de Préciosa et de la variété de Zélande ont été pressés à 300 atmosphères; une partie de chacun des deux jus est chauffée à 100° pendant 5 minutes, tandis qu'une autre portion ne l'est pas.

Pendant 12 heures, on immerge des tubercules coupés en deux des variétés Blanchard, Simson, Early rose, Préciosa et de Zélande à la fois dans les deux jus cru et cuit; on inocule ensuite avec de la pulpe et on met à l'étuve à 35°.

Après deux jours, les tubercules des variétés Blanchard et Early rose étaient fortement attaqués.

Simson, variété un peu plus résistante que les deux précédentes, avait été préservée par l'immersion dans le jus cru et cuit de Préciosa; l'immersion, dans le jus de la variété de Zélande, avait été moins efficace, car les tubercules étaient un peu attaqués.

Quant aux tubercules de Préciosa, ils avaient complètement résisté aux microbes; mais ceux de la pomme de terre de Zélande, immergés dans le suc de la même variété non chauffé, avaient perdu leur immunité naturelle, tandis qu'ils l'avaient gardée dans le même jus chauffé à 100°, et dans le jus de Préciosa, chauffé ou non.

Parmi ces résultats, le plus curieux est certainement l'immunité conférée aux tubercules de Simson par l'immersion dans le suc de Préciosa. Cette immersion a produit le même effet que l'injection, à un animal, d'un sérum immunisé.

Quant à la diminution de résistance provoquée chez la variété de Zélande par son propre jus, on doit probablement l'attribuer aux modifications chimiques provoquées par l'action de l'oxygène.

Il résulte des expériences exposées dans ce paragraphe que la résistance des tubercules de pomme de terre est due à l'existence de substances solubles qui existent dans le suc cellulaire, et dont le rôle peut être annihilé par des solutions alcalines. L'acidité totale des jus des tubercules ne correspond pas à l'action de ces substances protectrices.

V

DES VARIATIONS DE LA VIRULENCE CHEZ LE BACILLE PARASITE DES TUBERCULES

Le bacille, qui a été l'objet de ces recherches, est un microbe banal, très répandu dans le sol, l'air et les eaux, mais qui, comme je le montrerai plus loin, est rarement capable de vivre en parasite sur les tubercules de la pomme de terre et d'autres espèces. Il a fallu la rencontre de tubercules privés de résistance, par suite de conditions de cultures exceptionnelles, pour permettre au bacille de se développer sur la pomme de terre et la carotte. Dès lors, sa virulence s'est accrue par des passages successifs sur des tubercules peu résistants, au point que des variétés d'abord rebelles ont fini par se laisser envahir par le parasite. Nous retrouverons ici toutes les gradations entre un organisme saprophyte et le même organisme devenu virulent.

Après cinq ou six passages successifs sur des tubercules d'Early rose, Blanchard ou Marjolin, le bacille m'a paru avoir atteint son maximum de virulence, qui n'a pas été accrue par de nombreux passages consécutifs sur les mêmes variétés. On se rend aisément compte de la virulence par la rapidité du développement sur une variété déterminée cultivée dans la même parcelle.

La virulence disparaît dès que le microbe cesse d'être cultivé sur tubercule vivant. Un passage sur tranche cuite de tubercule suffit à supprimer l'aptitude au parasitisme. Ou bien, si, au lieu de le cultiver sur la pomme de terre, on utilise des bouillons ou des solutions diverses, on enlève la virulence. Et, dorénavant, sans procédé approprié, on ne pourra rendre au bacille son aptitude à vivre en parasite.

Les faits suivants vont le prouver à l'évidence.

Le bacille se laisse cultiver avec la plus grande facilité sur bouillon et moût de bière gélatinisés. Lorsqu'on met des colonies ainsi obtenues à la surface d'un tubercule coupé en deux, ou si, afin d'éviter toute chance de contamination, on enlève avec un emporte-pièce stérilisé un cylindre dans une pomme de terre pour l'introduire dans un tube stérilisé et l'inoculer ensuite, on n'obtient jamais de développement.

Le microbe se laisse facilement cultiver en solution minérale additionnée d'une matière organique assimilable. Le mélange minéral est indiqué à la page 8.

On peut, comme source de carbone, ajouter l'un des corps suivants :

Albumine de l'œuf,
Peptone,
Asparagine,
Acide aspartique,
Saccharose,
Raffinose,
Amidons cuits,
Glycogène,
Inuline,
Gomme arabique,
Acide pectique,
Dextrine,
Mannite,
Sorbite,
Glycose,
Galactose,
Glycérine,

Succinate de potassium,
Citrate —
Fumarate —
Malonate —
Lactate —
Hippurate de sodium,
Butyrate —
Bimalate d'ammoniaque,
Phloridzine,
Leucine,
Tyrosine,
Glycocolle,
Acétamide.

Je n'ai pas obtenu de développement aux dépens de :

Formiate de sodium,
Oxalate d'ammoniaque,
Acétate de sodium,
Tartrate neutre de potassium,
Tartrate d'ammoniaque,
Paratartrate de sodium et d'ammoniaque,

Valérianate de potassium,
Benzoate de sodium,
Gallate d'ammoniaque,
Phloroglucine,
Acide salicylique,
Hydroquinone,
Oxamide,
Urée.

Tous les mélanges organiques que je viens d'énumérer, et dans lesquels le bacille s'est développé, ont été déposés en quantité notable à la surface de tubercules de Marjolin coupés en deux, et légèrement excavés afin d'empêcher le liquide ensemencé de tomber. Pour beaucoup de solutions, les essais ont été répétés plusieurs fois en variant les concentrations. Jamais le bacille ainsi cultivé ne s'est développé sur tubercules vivants qui n'avaient subi aucune préparation spéciale.

Mêmes résultats lorsqu'aux tubercules de Marjolin, on a substitué ceux de variétés Early rose et Blanchard, cependant si peu résistantes.

Tout autres furent les résultats des mêmes ensemencements faits sur des tubercules de Marjolin, d'Early rose et de variétés plus résistantes lorsqu'ils avaient au préalable été plongés pendant une heure ou deux dans une solution de soude ou de potasse à 1 0/00 ; sitôt les tubercules retirés de la solution alcaline, on les lavait rapidement avec de l'eau stérilisée. et on y déposait quelques gouttes d'une culture dans les solutions organiques. Après 12 heures de séjour à l'étuve, il se formait à la surface du tubercule une matière beaucoup plus visqueuse que dans les cultures faites sur tubercules normaux.

Un examen microscopique montrait que cette matière visqueuse était formée de cellules peu dissociées, surtout dans la couche superficielle : plus profondément, la viscosité était moindre et la dissociation des cellules plus complète.

Un passage sur tubercule de Marjolin a prouvé que le microbe avait retrouvé sa virulence, et en 24 heures, à 35°, il a occasionné l'attaque des tubercules jusqu'à 10mm de profondeur.

La virulence du bacille disparaît donc dans les cultures en solutions nutritives, et pour la rendre il faut diminuer la résistance des cellules par l'intervention de solutions alcalines. Il semble que, dans les milieux artificiels, le bacille perde la propriété de produire les sécrétions alcalines sans lesquelles la diastase spéciale, qui lui permet de dissocier les cellules par la destruction des lamelles mitoyennes, est sans action sur la pomme de terre.

Et il est alors nécessaire de supprimer toute résistance de la part des cellules vivantes, pour permettre un premier développement du microbe, bientôt suivi de phénomènes de pénétration dans les cellules normales, à l'aide de sécrétions nécessaires.

Ce bacille, je l'ai déjà dit, est des plus répandus dans la nature. Il cause très rarement, dans les champs et les jardins, la pourriture des tubercules de pomme de terre, de navet, de topinambour et d'autres espèces. Wehmer et Frank [1] ne paraissent pas l'avoir observé dans leurs recherches. Les tissus attaqués se ramollissent par des altérations identiques à celles que l'on peut observer à la suite d'inoculations.

1. *Loc. cit.*

Hormis ces cas, où la virulence doit résulter de conditions spéciales (mauvaise culture, aération imparfaite, excès d'humidité, associations microbiennes favorables, etc.), le bacille étudié n'est pas souvent capable de vivre en parasite sur la pomme de terre. A la surface de tubercules peu résistants coupés en deux, j'ai déposé de la bouse de vache et d'autres excréments animaux, du fumier décomposé, du terreau, des terres de compost, d'étang, de jardin, de bois. Les cas d'altération des tubercules, mis à l'étuve, ont été très rares. Une terre reçue cet été du Haut-Congo avec des plantes a donné un assez grand nombre de colonies parasites de la pomme de terre ; beaucoup ont pu par des cultures appropriées (sur gélatine, sur tranche de pomme de terre, en solutions organiques) être identifiées avec le microbe étudié dans mes recherches actuelles. Il existe aussi dans certaines eaux : quand on en répand quelques centimètres cubes sur des tranches de tubercules non cuites, on voit parfois des colonies qui appartiennent aussi au *Bacillus coli communis*.

On comprend que, dans les milieux naturels, il soit presque toujours privé de virulence : il vit en saprophyte, aux dépens des cadavres et débris des plantes, et perd ainsi toute aptitude parasitaire. Nous savons qu'il peut retrouver sa virulence spontanément, puisqu'on le voit parfois provoquer la pourriture de diverses espèces à tubercules.

Dans l'air, les germes du *Bacillus coli communis* possèdent rarement la virulence qui leur permet de vivre en parasites sur la pomme de terre. On l'observe cependant quelquefois sur des tubercules coupés exposés à l'air : c'est même ainsi que j'ai pu me procurer une race parasite sur les tubercules de Marjolin, cultivés dans la parcelle qui avait été fortement chaulée.

La lumière altère la virulence de ce microbe comme elle diminue celle des bactéries pathogènes des animaux ; des tubercules de Marjolin, ensemencés avec du bacille du 30e passage et placés sous cloche en plein soleil les 2 et 3 octobre, sont restés intacts, même lorsqu'on a remis les cultures à l'étuve. L'action relativement affaiblie des rayons solaires avait diminué la vitalité des germes et préservé les tubercules.

La chaleur permet également de diminuer et même de supprimer la virulence. De la pulpe prise sur des tubercules Mar-

jolin a été mélangée à un peu d'eau stérilisée, puis chauffée pendant 10 minutes à 45°, 50°, 55° et 60°. Le chauffage à 45° et à 50° ne provoque aucune diminution dans la rapidité du développement lorsqu'on inocule à des tubercules de Marjolin. Il en est autrement du chauffage à 55° et 60°; le microbe n'est pas tué, commence par donner de petites colonies qui s'arrêtent peu de temps après, et il y a cicatrisation du tubercule.

A 40°, la pomme de terre n'est plus attaquée par le bacille, bien que celui-ci puisse continuer à se développer jusqu'à 45°.

Il n'est plus virulent à haute température, de même que la bactéridie charbonneuse. Il y a probablement des modifications dans la nature des sécrétions du microbe.

D'autres changements surviennent dans la virulence lorsqu'on fait des passages entre tubercules d'espèces différentes, comme il s'en présente pour certaines bactéries pathogènes que l'on inocule successivement à diverses espèces animales. Ainsi le *B. coli communis*, cultivé d'abord sur la pomme de terre, puis sur ognon, dégénère bientôt; dès le deuxième passage sur ognon, les cellules de cette espèce ne se laissent plus dissocier. Il en est de même si l'on passe de la pomme de terre sur diverses variétés de radis et de navet. Les tissus de ces deux espèces ainsi infectés ont une réaction nettement acide, et l'acidité de ceux de l'ognon est encore plus forte. J'attribue ces résultats aux substances sucrées que contiennent les bulbes et le navet, et qui, assimilées par le bacille, donnent, comme résidus, des acides organiques en plus grande proportion que chez la pomme de terre.

Après avoir subi l'influence de ces milieux acides, le bacille semble privé de la propriété de sécréter les substances alcalines qui sont nécessaires à la destruction des lamelles mitoyennes.

Chez le topinambour, ce sont les tubercules de la P. I (avec engrais azotés) qui se sont montrés les moins rebelles à l'invasion microbienne.

Les inoculations à des betteraves sucrières et demi-sucrières n'ont guère réussi; seules des racines provenant d'un sol peu fertile ont fourni des cultures assez florissantes.

Le bacille du 20e passage a été aussi inoculé à des espèces diverses à la température ordinaire :

Racines de radis rose et noir ; tubercules de chou-rave et de

chou-navet, raquettes d'*Opuntia Ficus indica*; tiges de *Bryophyllum calycinum*; tiges de *pourpier et tétragone*; pédoncules floraux de *Crinum Mac Owani*; feuilles charnues de *Sanseviera cylindrica*; feuilles charnues de *Cotyledon fascicularis*; feuilles charnues d'*Aloe arborescens*; fruit de courge.

Partout le microbe s'est développé au voisinage du point d'inoculation et y a formé de petits amas visqueux. Sur l'*Opuntia*, il s'est produit de grandes taches brunes, taches de pourriture, qui ont fini par envahir toute la raquette.

VI

COMMENT LE BACILLE ENVAHIT LES TUBERCULES

Une coupe faite perpendiculairement à la surface d'un tubercule attaqué par le bacille de la pourriture montre qu'en dessous de la pulpe formée par les cellules dissociées et bourrées de bactéries, il y a une zone privée complètement de microbes, et où cependant les cellules commencent à se séparer et présentent leur protoplasme contracté. Il semble que, de la région envahie par les microbes, des produits solubles filtrent au travers des cellules sous-jacentes et réagissent à la fois sur les lamelles mitoyennes et le protoplasme. Afin de les étudier, on a raclé des pommes de terre inoculées et fortement entamées; la pulpe a été mélangée à un peu d'eau, puis on a filtré à la bougie Chamberland. Le liquide filtré, de couleur jaunâtre, avait, comme la pulpe du reste, une réaction nettement alcaline.

Après neutralisation avec l'acide chlorhydrique étendu, le liquide filtré a été partagé en douze portions. Deux servent de témoins; aux autres, on ajoute 1/2 et 1 0/0 de l'un de ces acides : formique, acétique, tartrique, lactique, et les mêmes doses de soude. Dans chaque potion, on a immergé de petits morceaux de tubercule de Marjolin et une goutte d'essence de moutarde pour empêcher le développement de microbes.

Douze heures plus tard, les cellules des deux témoins sont toutes dissociées jusqu'à 2 et 3 millimètres de profondeur, et leur protoplasme est contracté. Il en est de même là où l'on a ajouté 0,5 0/0 d'acide tartrique, 0,5 et 1 0/0 de soude; mais par suite de l'addition de 1 0/0 d'acide tartrique, d'acide lactique à 0,5, d'acide acétique à 0,5 et 1 0/0, la désagrégation est toute super-

ficielle : toutefois, les cellules ont leur protoplasme contracté. En présence d'acide lactique à 0,5 et 1 0/0, d'acide formique à 1 0/0, d'acide citrique à 1 0/0, d'acide oxalique à 0.5 et 1 0/0, il n'y a aucune dissociation des cellules.

Au lieu de morceaux de pomme de terre immergés dans les liquides filtrés obtenus en délayant la pulpe de cette espèce, on peut immerger des morceaux de navet ; la dissociation des cellules est encore plus rapide et plus nette. J'ai vu des tranches de navet épaisses de 5 millimètres complètement amollies, réduites en miettes au bout de 20 heures à la température ordinaire.

La réaction de la pulpe et du liquide qu'elle donne quand on la délaye dans l'eau varie avec la nature des espèces attaquées par le microbe. Avec le navet, la pulpe est légèrement acide; le liquide, laissé tel quel, attaque les tissus de la pomme de terre et du navet. Additionné de 0,25 0/0 de soude, il attaque encore la pomme de terre, mais plus le navet. Au contraire, si le liquide naturel est additionné de 0,25 0/0 d'acide lactique, il est sans action sur la pomme de terre, mais provoque la dissociation.

Un liquide très actif, à réaction nettement alcaline, et dans lequel les produits devaient être plus concentrés, a été obtenu avec des pommes de terre; à l'état naturel, il attaquait énergiquement les lamelles mitoyennes de cette espèce, et causait un ramollissement rapide et profond des tissus. Il en était de même lorsqu'on y ajoutait 0,25 et 0,5 0/0 de soude. Dans l'un et l'autre cas, le navet n'était pas attaqué, mais le résultat était tout différent quand on ajoutait au liquide naturel 1 ou 2 0/0 d'acide lactique.

Évidemment ces résultats ne peuvent se comprendre que par des différences de structure ou de composition des lamelles mitoyennes des membranes du navet et de la pomme de terre.

Chez l'oignon cultivé inoculé, la réaction de la pulpe est très fortement acide, et la désagrégation est alors très nette, ainsi que la contraction protoplasmique. Mais, nous le savons déjà, le microbe ainsi cultivé devient incapable de se développer sur pomme de terre, même sur les tubercules des variétés les moins résistantes. Il est dégénéré, ou plus exactement a perdu sa virulence, parce que sans doute il ne peut plus sécréter les substances alcalines qui permettent à la diastase spéciale d'agir sur les membranes de la pomme de terre.

Une dégénérescence semblable a été observée après des inoculations de pomme de terre avec de la pulpe d'un navet dont l'attaque avait été très rapide.

Non seulement le microbe sécrète des substances solubles actives lorsqu'on le cultive comme parasite sur les tubercules, il en produit aussi dans les cultures en solutions organiques, ce qui prouve qu'il n'y a pas, comme on l'a dit, une relation étroite entre les aliments des microbes et leurs sécrétions diastasiques. Des cultures du bacille en solution minérale avec 5 0/0 de saccharose ou de glycérine ont été filtrées ; une partie de chaque liquide fut neutralisée avec la soude. Dans les deux portions, on a plongé des tranches minces de pomme de terre et de navet. Cette dernière espèce a été assez fortement attaquée dans la solution acide : la pomme de terre ne l'était guère. Quant à la solution neutralisée, elle est restée sans action sur les tubercules des deux espèces.

Chauffé à 62°, le liquide obtenu par délayage de pulpe de pommes de terre attaquées ne dissout plus les lamelles mitoyennes; les cellules restent adhérentes et les tissus gardent leur consistance. On remarque cependant une altération de la couche superficielle ; le protoplasme est contracté et assez souvent désorganisé.

On obtient les mêmes résultats par l'exposition du liquide filtré au soleil pendant huit heures; on les a même constatés à la fin de septembre et au commencement d'octobre, sous l'influence d'une radiation déjà affaiblie.

Ces diverses propriétés des tissus atteints montrent nettement que les liquides mis en expérience contiennent une diastase qui dissout les lamelles mitoyennes, et une autre substance, peut-être plusieurs autres, qui déterminent la contraction du protoplasme, finissent par le tuer, et qui en même temps réagissent sur la digestion de la cellulose.

L'existence de la diastase, une variété de *cytase*, a été établie par la précipitation de l'alcool : plusieurs liquides, filtrés à la bougie Chamberland, traités par cinq volumes d'alcool, ont donné des précipités floconneux blanchâtres. Ceux-ci, dissous dans un peu d'eau distillée et additionnée d'essence de moutarde, causaient le ramollissement et la désagrégation des cellules des morceaux de pomme de terre qui y avaient été immergés pendant 12 heures. Il y avait aussi contraction du protoplasme.

Malgré de nombreuses recherches, je n'ai pu déterminer quelle catégorie de substances interviennent dans la contraction et la mort du protoplasme. Elles varient peut-être selon la nature des espèces tuberculeuses attaquées, puisque les sécrétions du bacille chez la pomme de terre sont alcalines et acides sur le navet. Chez la première espèce, les sécrétions qui coagulent le protoplasme sont un peu plus résistantes à la chaleur que la cytase, mais elles sont détruites à 100°.

Le *Bacillus coli communis* ne sécrète pas d'amylase : aussi les grains d'amidon des cellules dissociées restent entiers ; souvent ils sont gonflés légèrement, et leurs couches concentriques deviennent mieux visibles. Les dessins qu'a faits Wehmer de cellules de pomme de terre attaquées par les bactéries qu'il a étudiées, représentent exactement les effets de l'infection actuelle. On peut même préparer de la fécule relativement pure en broyant la pulpe après dessiccation.

C'est aux substances solubles autres que la cytase qu'il faut attribuer, sans conteste, la diminution de vitalité des cellules qui nous apparaît finalement sous l'état de protoplasme coagulé. Ainsi altérée, la matière vivante est sans défense devant la pénétration microbienne, et celle-ci se trouve encore facilitée par la destruction des lamelles mitoyennes. Il importe, en effet, que celles-ci disparaissent pour permettre aux microbes d'atteindre des couches de tissus de plus en plus profondes, puisque les membranes cellulosiques sont un obstacle à la diffusion rapide des organismes envahisseurs chez les végétaux supérieurs.

En réalité, les sécrétions du bacille jouent ici un rôle absolument comparable aux toxines animales. Il faut nous attendre à trouver que ces sécrétions vont avoir une action défavorable sur la résistance des variétés les plus rebelles aux microbes. L'expérience a encore confirmé cette prévision.

Plusieurs fois, on a immergé des moitiés de tubercules des variétés Chave, Chardon, Préciosa, de Zélande tout à fait résistants, dans des liquides filtrés de pommes de terre attaquées, liquides non chauffés ou chauffés à 100° pendant 10 minutes. L'immersion des surfaces de section se prolongeait pendant 3 ou 5 heures, puis on les inoculait avec un peu de pulpe de pomme de terre pourrie. Après 15 heures à l'étuve, les tubercules de Chave, Chardon et de Zélande étaient toujours profon-

dément atteints; Préciosa, au contraire, était un peu plus résistante.

Dans les essais avec les liquides non chauffés, il y avait action simultanée des diverses sécrétions du microbe, y compris la cytase. Le chauffage à 100° avait détruit non seulement celle-ci, mais aussi la substance qui coagule le protoplasme; néanmoins, le liquide était encore capable de diminuer la résistance des variétés les plus rebelles. Il faut nécessairement admettre qu'après chauffage à 100°, les liquides filtrés renferment encore des substances dont l'action est analogue à celles de toxines.

VII

ÉTUDE COMPARÉE DU BACILLE DES TUBERCULES POURRIS ET DE QUELQUES BACILLES ANALOGUES

Ainsi que je l'ai dit précédemment, le bacille étudié dans mes premières recherches était le *Bacillus fluorescens putidus*; l'autre est, sans aucun doute, une forme du *B. coli communis*. Comme le type si souvent observé par les bactériologistes, il ne liquéfie pas la gélatine, donne des bulles gazeuses lorsqu'on l'inocule en piqûre dans le moût de bière gélatinisé: il se développe mieux en présence de l'oxygène que dans le vide, mais peut se développer plus ou moins abondamment en anaérobie. Privé d'air, il réduit les nitrates avec une grande énergie, propriété qui a été signalée pour le *B. coli*, par MM. Hugounenq et Doyon[1], et plus récemment par M. Grimbert[2].

Désireux de compléter les analogies entre mon bacille et le véritable *B. coli*, j'ai demandé à MM. Calmette (Lille), Malvoz (Liège), et Van Ermengem (Gand), des types authentiques de cette espèce. Ces messieurs m'ont envoyé non seulement le *B. coli*, mais encore quelques formes voisines, entre autres le bacille typhique, avec un empressement auquel j'ai plaisir à rendre ici hommage.

Divers essais de culture ont été faits avec ces microbes en solutions minérales diverses, sur milieux solides variés, sur tubercules normaux et traités par des solutions légèrement alcalines.

1. *Annales de chimie et de physique*, 7e série, t. XV, p. 145.
2. *Société de biologie*, séance du 10 déc. 1898 et dans ce numéro.

Pendant cet été, j'avais isolé plusieurs races du colibacille de tubercules divers, qui avaient été inoculés, et de divers mélanges nutritifs. Je m'empresse de dire que dans ces conditions les caractères essentiels du microbe ne sont pas modifiés d'une façon quelque peu durable. Dans le bouillon, sur tranches cuites de pomme de terre, sur moût de bière ou bouillon gélatinisés ou gélosés, le microbe a les mêmes aspects de développement.

Ces diverses races du bacille des tubercules ont d'abord été comparées avec les trois *B. coli* reçus de Gand, de Liège et de Lille. On les a cultivées simultanément dans la solution minérale additionnée de :

Saccharose,	Tartrate de K,
Lactose,	— d'AzH^4.
Glycose,	Acétate de K,
Mannite,	Formiate de Na.
Glycérine,	
Succinate de K,	
Lactate de K,	
Citrate de K,	
Bimalate d'AzH^4,	
Butyrate de Na,	
Hippurate de Na,	
Asparagine,	
Peptone,	

Tous se sont développés aux dépens des treize corps imprimés à gauche du tableau, en donnant un trouble plus ou moins marqué, et partout un mycoderme ou un anneau mycodermique.

La lactose, le citrate de potassium, l'hippurate de sodium, l'asparagine et surtout la peptone donnent lieu à un développement très actif. Au contraire, les quatre corps imprimés à droite ne sont pas assimilés.

Les microbes comparés ont été inoculés sur des tubercules de même variété, coupés en deux et immergés pendant 3 heures dans une solution de soude de 1 0/00. Tous se sont développés avec une activité égale sur la pomme de terre ainsi préparée, et des passages ultérieurs sur tubercules non préparés ne permettaient pas d'établir de différences entre les diverses formes comparées. Chacune était devenue parasite pour la pomme de terre, le navet et les autres tubercules.

Des essais du même ordre ont été entrepris avec les bacilles suivants :

Bacilles typhiques de Gand, Liège et Lille ;
Bacillus enteridis, de Gaertner ;
Bacille de la viande de veau de Moorzeele, de Van Ermengem ;
Bacille de Friedlænder ;
Bacille du foie de Lambert, de Van Ermengen.

Tous ces microbes, cultivés sur milieux gélatinisés et sur pomme de terre cuite, présentent avec le *B. coli* des ressemblances qui ont préoccupé à plusieurs reprises les bactériologistes.

Il y avait aussi des essais de culture avec :

Bacillus fluorescens putidus ;
— *liquefaciens* ;

et un bacille à colonies jaunes isolées de tomates pourries.

Ce dernier microbe ne s'est pas développé dans les diverses solutions minérales et appartient donc à un groupe nettement différent de tous les autres, capables de vivre en solutions organiques.

Aucun bacille typhique ne s'est développé, comme on devait s'y attendre, dans la solution de lactose ; on sait que cette espèce est incapable d'assimiler ce sucre, ce qui permet de la distinguer du *B. coli*.

Les bacilles typhiques ont utilisé la mannite, la glycérine, le succinate, le citrate et le lactate de potassium, mais non les tartrates, le bimalate, le butyrate, l'hippurate, le formiate et l'acétate.

Dans ces essais, le bacille de Friedlænder s'est comporté comme le *B. coli*, mais s'est montré plus actif dans les solutions de saccharose, de glycose, de mannite, de glycérine, de succinate d'ammoniaque.

Le *B. fluorescens liquefaciens* s'est développé aux dépens de : saccharose, glycose, mannite, glycérine, succinate d'ammoniaque.

Nous connaissons déjà les exigences du *B. liquefaciens putidus* (page 8) : elles diffèrent peu de celles du colibacille et du B. Friedlænder. Il en est de même du B. de Moorseele, qui s'est développé abondamment dans la glycérine, le succinate, le lactate,

le citrate, le tartrate, mais qui assimile aussi, mais plus difficilement, la saccharose, la lactose, la glycose, la mannite, le bimalate et le butyrate.

Le *Bacillus enteridis* a des aptitudes peu distinctes : outre les corps utilisés par le bacille de Moorseele, il a assimilé l'hippurate de sodium.

Le bacille du foie de Lambert se rapproche par ses aptitudes du B. de Moorseele, mais a moins bien assimilé le lactate de potassium.

En somme, ces différents types de bacilles, si ressemblants par leur développement morphologique, sont distincts par leurs capacités chimiques, et on ne pourrait actuellement les identifier d'une façon certaine, comme je l'ai fait pour les bacilles des tubercules et le *B. coli communis*.

Ces différences sont-elles le résultat d'adaptations anciennes dont il serait expérimentalement possible de faire disparaître les effets? C'est là une question à laquelle seules de longues recherches pourront donner une réponse définitive.

Tous les microbes indiqués plus haut, cultivés dans du bouillon peptonisé, ont aussi été inoculés simultanément sur tubercules d'une même variété peu résistante non dénommée[1]; une partie des tubercules était à l'état normal, et une autre avait été immergée dans la solution de soude à 1 0/00 pendant 3 heures.

Pas un tubercule laissé à l'état normal n'a été attaqué par les diverses formes inoculées; aucune ne peut donc, après culture dans du bouillon peptonisé, vivre en parasite sur la pomme de terre. Toutes en sont capables lorsqu'on a soin de leur préparer le terrain, de diminuer la résistance des cellules par une solution alcaline. Et non seulement les divers microbes envahissent le tubercule convenablement préparé, mais à partir de ce moment, on peut les faire vivre en vrais parasites sur les tubercules des variétés Marjolin, Early Rose, Simson, Blanchard.

Parmi tous les microbes ainsi devenus parasites des plantes, celui qui m'a le plus étonné est le B. typhique. En 30 heures, à l'étuve à 35°, il avait attaqué les tissus du tubercule jusqu'à 4 et 5 mm. de profondeur : sa virulence pour la pomme de terre

1. C'est probablement la variété Jaune ronde hâtive.

était supérieure à celle des diverses races de *B. coli communis*, même après de nombreux passages sur cette espèce.

Le deuxième passage du bacille typhique sur la pomme de terre était plus actif encore : la couche pulpeuse avait 10 et 12 mm. d'épaisseur après 24 heures à l'étuve.

Les autres espèces inoculées sur tubercules plongés dans la solution alcaline n'ont pas eu un développement aussi abondant que le bacille typhique. Les colonies étaient moins nombreuses, souvent isolées à la surface de la section, et ce n'est qu'aux passages suivants que l'aptitude parasitaire devenait bien nette.

Remis en culture sur milieux gélatinisés, les bacilles typhiques et les diverses espèces devenues parasites de la pomme de terre avaient les mêmes caractères que dans les cultures originelles. Il serait sans doute intéressant de prolonger ces essais et de les multiplier. Peut-être finirait-on par observer des phénomènes de variation définitifs.

VIII

OBSERVATIONS FAITES SUR QUELQUES MALADIES BACTÉRIENNES DES PLANTES

Dans le cours de ces recherches, mon attention a naturellement été attirée par certaines affections microbiennes des plantes cultivées.

L'une des plus curieuses est une altération gommeuse des tubercules de *Cattleya Mossiæ* (orchidée) que j'ai eu l'occasion d'étudier en septembre dans les serres de M. D. Massange de Louvrex, à Baillonville (province de Namur). Déjà en 1889, lors de l'Exposition d'horticulture du Trocadéro, j'avais eu l'occasion d'étudier cette maladie au laboratoire de M. Duclaux. Elle consiste dans le ramollissement des tissus des tubercules ; ils deviennent brun foncé, puis noirs.

Si, avec les précautions antiseptiques nécessaires, on prend des tissus atteints pour les mélanger à du moût de bière gélatinisé, on y voit bientôt apparaître de nombreuses colonies formées de courts bacilles. Dès 1889, j'avais été assez disposé à attribuer à ces microbes l'altération des tissus, sous l'influence de conditions peu normales de culture (vraisemblablement d'un excès d'engrais azotés). Les cultivateurs d'orchidées reconnais-

sent du reste que l'emploi du purin comme engrais cause la pourriture gommeuse chez leurs plantes favorites.

Cette année encore j'ai isolé les bactéries contenues dans deux pieds de *Cattleya* appartenant à M. Massange de Louvrex, et j'y ai retrouvé des microbes analogues à ceux que j'avais vus il y a neuf ans. Par des cultures comparatives, je me suis assuré que ce n'est qu'une forme du *B. coli*, capable de se développer aussi vigoureusement sur pomme de terre quand on lui donne pour milieu de culture préparatoire des tubercules traités par la solution de soude 1 0/00.

Les épidémies bactériennes signalées de temps à autre parmi les *Cattleya* cultivés dans les serres d'Europe sont sans nul doute causées par une alimentation anormale, telle que l'emploi d'engrais azotés.

Les faits révélés par les expériences sur la pomme de terre nous permettent de comprendre cette influence indirecte de troubles nutritifs.

Une autre maladie microbienne est la pourriture noire des fruits de tomate.

J'ai isolé aussi le microbe qui existait dans les tomates ainsi attaquées; c'est aussi un bacille, mais bien différent du *B. coli* : il ne croît pas dans les solutions minérales comme cette espèce; sur pomme de terre, il donne des colonies jaunes d'or, et il ne liquéfie pas le bouillon gélatinisé.

Je n'ai jusqu'ici fait aucune observation sur les relations entre le développement de ce bacille et les conditions de culture des tomates.

Une autre maladie de la tomate m'a été signalée cet été à Wavre (Brabant). Dans une serre, tous les pieds de tomate ont été envahis subitement par un bacille qui en a fait pourrir les tiges au bout de quelques jours. Il a fallu arracher tous les plants et renoncer à la culture de la tomate.

La culture du microbe m'a montré que c'était une forme de *Bacillus fluorescens liquefaciens* : d'après les renseignements qui m'ont été fournis par le cultivateur, la maladie n'avait d'autre cause que l'emploi de quantités énormes de fumier et d'engrais liquide [1].

1. ERVIN F. SMITH a décrit sous le nom de *Bacillus solanacearum* une bactérie strictement aérobie qui se développe dans les organes de la pomme de

Il y a peu de temps, je visitais à Louvain des serres dans lesquelles les maraîchers cultivent depuis quelques années la tomate en grand. L'un de ces praticiens me conta un fait qui témoigne d'un réel esprit d'observation et qui s'explique aisément à la lumière des recherches actuelles.

Dans une serre qui avait produit des tomates, une partie du terrain avait été grossièrement labourée et une autre était restée sans soin pendant tout l'hiver. Au printemps, on y avait planté partout de jeunes pieds de tomates, qui se développèrent vigoureusement là où le sol avait été remué, et par conséquent mieux aéré pendant l'hiver. Ailleurs, les tomates n'ont pas poussé et il fallut les jeter. Depuis lors, le maraîcher a toujours soin de bêcher après chaque récolte le sol de ses serres à tomates, qui, bien que cultivées chaque année, avec des engrais abondants, ne présentent plus trace de maladie.

On a le droit de supposer que parmi les microbes qui pullulent dans les terrains richement fumés, il en est diverses espèces capables de devenir parasites sur la tomate, après un premier développement comme saprophytes sur les racines de cette espèce. Si ce mode de vie se prolonge jusqu'au printemps, les microbes seront encore assez actifs, assez virulents au moment de la plantation de jeunes pieds de la même espèce. Et ceux-ci seront exposés à être attaqués. Au contraire, si l'on retourne la terre, la décomposition des racines est plus rapide et les microbes qui la provoquent auront perdu leur virulence lorsque quelques mois plus tard ils se trouveront en contact avec les racines des jeunes plants.

La biologie du *Bacillus coli communis* nous permet de comprendre l'apparition de maladies bactériennes parmi les plantes cultivées, surtout lorsque les conditions de nutrition ne sont plus régulières. C'est souvent le cas dans les jardins maraîchers, dans la culture des primeurs, dans les cultures forcées.

Je viens de citer trois espèces de bactéries banales très répandues dans la terre, et qui peuvent acquérir des aptitudes parasitaires pour les plantes supérieures. Il en est sans doute beaucoup d'autres; plusieurs des bactéries décrites par différents

terre, de la tomate et de l'aubergine, et qui diffère beaucoup de celle que j'ai observée (*Bull. of U. S. Department of Agriculture, Division of Vegetal Physiology and Pathology*, n° 12, 1896).

auteurs comme parasites des végétaux me paraissent appartenir à cette catégorie. Telle l'espèce décrite par MM. Prillieux et Delacroix [1] sous le nom de *Bacillus caulivorus*, et qui vit dans les tiges de pomme de terre, de *Pelargonium*, les feuilles de *Begonia*, de *Gloxinia*. Elle n'est très probablement qu'une forme du *B. fluorescens liquefaciens*.

Voici encore quelques propriétés du *B. coli communis* parasite des tubercules.

Sur pomme de terre (Marjolin), il ne s'est pas développé à la température de 10-12°, ni au-dessus de 40°.

Il n'attaque pas la cellulose du papier à filtrer, ni celle du coton, de la moelle de sureau, ni des graines de dattier, même si l'on introduit de la glycérine dans la culture pour permettre au microbe de se développer vigoureusement.

Des liquides obtenus en délayant de la pulpe de tubercules attaqués, puis filtrés, très actifs sur les tissus de la pomme de terre, ont été sans action, même après plusieurs jours, sur les variétés de cellulose précitées.

Des cultures dans du bouillon peptonisé, chauffées pendant cinq minutes à 75°, sont stérilisées.

Le bacille n'a pas présenté de spores.

IX

OBSERVATIONS SUR LE PHYTOPHTHORA INFESTANS

Comme pour la maladie bactérienne des tubercules, il existe aussi des relations entre la nutrition minérale des plantes et le développement de leurs champignons parasites.

Les diverses variétés de pomme de terre cultivées dans le champ d'expériences ont donné lieu aux constatations suivantes.

Jusqu'au 6 juillet, il n'y avait aucune trace de *Phytophthora infestans* sur les feuilles. Le lendemain matin, les trois touffes de la la variété Early rose de la P. I sont fortement attaquées par cette Péronosporacée; les feuilles sont devenues jaunâtres, présentent beaucoup de taches brunes, et, à la face inférieure, il y a de nombreux filaments conidifères.

Sur les touffes de Marjolin de la P. I, il y a quelques vieilles feuilles malades.

1. *Comptes rendus*, t. CXI, page 208.

Ailleurs, il n'y a aucune trace de parasite, ni sur les autres variétés de la P. I et ni dans les autres parcelles, pas même sur les plants d'Early rose.

Deux poignées de feuilles malades, coupées dans un champ de Marjolin, abondamment pourvues de filaments conidifères, ont été agitées dans de l'eau, que l'on a répandue sur les cinq parcelles au moyen d'un pulvérisateur ; on a fait de même sur la P. VI (sans engrais), qui, trois jours auparavant, avait été traitée à la bouillie bordelaise.

Le 8 juillet, toutes les pommes de terre du champ d'expériences ont été examinées avec le plus grand soin.

La maladie avait, en 24 heures, fait des progrès très rapides et très instructifs.

P. I. Les variétés Early rose, Chardon, Blanchard et Marjolin sont très fortement attaquées.

Chave et de Zélande ordinaire le sont peu, et Pousse debout et Simson sont intactes.

P. II. A peine quelques feuilles malades chez Marjolin et de Zélande. La résistance à la maladie est évidente de même que dans la parcelle suivante.

P. III. Chave et Early rose ont seulement quelques feuilles atteintes.

P. IV. Marjolin assez fortement attaquées, mais moins que dans P. I. Sur Chave et Pousse debout, feuilles malades assez nombreuses.

P. V. Marjolin fort malade, mais moins qu'en P. I ; Chave, Early rose, Pousse debout ont quelques feuilles attaquées.

P. VI. Quelques feuilles malades sur Marjolin et Early rose.

Les progrès de la maladie furent notés : le 16 juillet, par une journée chaude qui suivait plusieurs jours pluvieux et froids ; le 21 juillet, après cinq jours chauds et secs.

Voici le résumé des observations :

Les variétés très sujettes à la maladie, Early rose, Marjolin et Chave ont été les premières atteintes, mais seulement dans la P. I. ; les mêmes variétés ont d'abord résisté dans les autres parcelles à peu près complètement. Huit jours plus tard, ces variétés étaient nettement attaquées, sauf dans les P. V et VI où les progrès de la maladie ont été ralentis par suite de l'influence du

chlorure de sodium et surtout de la bouillie bordelaise.

Des variétés peu exposées à la maladie, Chardon, Simson. Pousse debout, la première, dans la P. I, a été fortement attaquée dès le premier jour de l'apparition de la maladie. Le 16 juillet, les tiges étaient complètement décomposées. Dans les autres parcelles, la même variété a été très peu ou pas malade.

Simson, un peu attaquée dans la P. I, ne l'est pas du tout dans les autres parcelles.

Des variétés, Blanchard et de Zélande, considérées, en Belgique, comme très exposées au *Phytophthora*, ont été un peu endommagées dans les P. I et IV, mais ont relativement bien résisté ailleurs.

En somme, l'influence des engrais azotés sur la prédisposition de la pomme de terre à être envahie par le *Phytophthora* est incontestable. Les nitrates, les sels ammoniacaux et le fumier, employés en abondance, diminuent la résistance même chez les variétés les plus résistantes (Chardon, Simson, Pousse debout). L'opinion des praticiens est donc très légitime.

La chaux paraît aussi favoriser l'extension de la maladie; ce n'est probablement qu'une influence indirecte en stimulant les phénomènes de nitrification aux dépens des matières organiques azotées.

Lors de l'arrachage des tubercules, on a constaté que beaucoup de tubercules étaient malades dans les P. I et V pour Early rose, et dans la P. V pour Chave. Ceci s'explique par l'influence du chlorure de sodium sur les propriétés physiques du sol : la terre était devenue très compacte et fort humide.

Voici encore un fait qui montre l'action des engrais azotés sur le développement du *Phytophthora infestans*.

Le 12 août, j'ai coupé en deux des tubercules sains de Marjolin, récoltés dans les cinq parcelles; sur chaque moitié, j'ai déposé une foliole de pomme de terre portant des filaments conidifères, et j'avais soin de tourner la face inférieure du côté de la section du tubercule, de manière à y laisser tomber des conidies.

Au bout de sept jours, les tubercules des P. I et IV étaient recouverts d'un mycélium assez abondant, et on y voyait au microscope de vigoureux filaments conidifères du *Phytophthora*.

Il n'y en avait pas sur les tubercules des autres parcelles. Ceux-ci ne se sont pas altérés et les autres n'ont pas tardé à présenter les taches brunes caractéristiques de la maladie.

Le mycélium, ainsi développé, a servi à de nouvelles tentatives d'inoculation, qui ont donné les mêmes résultats.

X

OBSERVATIONS SUR LES SCLEROTINIA

Le *Sclerotinia Fuckeliana*, dont la forme conidienne est le *Botrytis cinerea*, et surtout le *Sclerotinia Libertiana* peuvent être inoculés aux plantes à tubercules et à d'autres espèces. Déjà de Bary avait soumis le *S. Libertiana* à d'intéressantes expériences sur le parasitisme. (Voir page 3.) Je les ai reprises en les dirigeant vers le but que je poursuivais dans mes recherches sur la pomme de terre.

Quelques essais faits avec les conidies de *Botrytis cinerea* n'ont guère réussi. Cette espèce tend à se répandre comme parasite chez plusieurs plantes cultivées (vigne, lis, balsamine, rosier, etc...) Je n'en ai pas observé de cas cette année, et n'ai donc pu faire des cultures en partant d'une forme nettement parasitaire.

Du *Botrytis cinerea*, développé sur des raisins pourrissants, a été cultivé sur moût de bière gélatiné, puis ensemencé sur des tubercules de carotte, de chicorée à grosse racine et de topinambour, récoltés dans les cinq parcelles du champ d'expériences et placés à l'obscurité.

Seules les carottes ont été atteintes, surtout celles de la P. II; celles des P. I et V l'étaient moins, et beaucoup moins encore celles qui provenaient des P. III et IV. Le mycélium du *Botrytis* avait amolli les tissus des racines, et des filaments conidifères sont apparus à la surface.

Les tubercules de topinambour se sont montrés rebelles aux inoculations répétées de conidies du *Botrytis cinerea*. Par contre, ils sont facilement attaqués par le mycélium du *Sclerotinia Libertiana*, qui dans certaines cultures provoque même une affection contagieuse, soit sur les tubercules et la base des tiges des plantes en végétation, soit sur les tubercules conservés en cave. J'en ai rencontré un cas à la fin de septembre, et j'ai obtenu

ainsi une race de *Sclerotinia* dont la virulence était déjà très développée. Elle a été inoculée le 30 octobre sur des tubercules coupés en deux de topinambour, de carotte et de chicorée à grosse racine, de betterave et de pomme de terre conservés en atmosphère humide à l'obscurité et à la température de 20 à 25°.

Le 4 novembre, les tubercules de topinambour des P. I et III sont très nettement envahis et recouverts de mycélium : les tissus attaqués sont devenus très mous, et, au microscope, on voit le protoplasme contracté à l'intérieur des cellules.

Les tubercules P. II, IV et V ne sont attaqués qu'au voisinage des points d'inoculation du mycélium, ne portent pas de filaments mycéliens ou très peu, et leurs tissus sont restés fermes.

Ce résultat concorde avec deux observations faites, l'une en 1896, l'autre cette année dans un champ de topinambour. On en avait planté sur l'emplacement d'un tas de fumier, dont une quantité assez grande avait été enfouie sur place. Ainsi abondamment pourvus d'engrais azotés, les topinambours végétèrent vigoureusement, mais furent en octobre atteints par le *Sclerotinia Libertiana*.

La partie inférieure des tiges était recouverte d'un mycélium blanc qui a donné plus tard des sclérotes ; beaucoup des tubercules ont pourri par suite de l'invasion des filaments mycéliens.

Une seconde épidémie de *Sclerotinia* a été provoquée cette année à la suite de l'emploi de superphosphate de chaux sur un petit carré tracé au milieu du champ. Les symptômes étaient les mêmes qu'en 1896.

Voilà un résultat tout à fait inattendu : l'acide phosphorique prédispose le Topinambour à la pourriture, tandis qu'il protège la pomme de terre à la fois contre l'invasion bactérienne et celle du *Phytophthora*. Nous en aurons bientôt l'explication.

Parmi les tubercules de carotte et de chicorée, inoculés le 30 octobre, ce sont surtout ceux de la P. II qui sont atteints, recouverts de longs filaments mycéliens, et en grande partie ramollis, sans consistance.

Les racines des deux espèces récoltées dans la P. IV sont moins attaquées que celles de la P. II ; celles de la P. I, moins encore que celles de la P. IV.

De la P. III. les carottes ont bien résisté, tandis que les chicorées sont fortement attaquées et ramollies.

Au contraire, les carottes de la P. V sont assez fortement attaquées, et les chicorées de la même parcelle le sont peu ou point.

Il faut conclure que les engrais potassiques prédisposent la carotte et la chicorée à l'infection par le *Sclerotinia* : les phosphates diminuent cette prédisposition chez la carotte, et le chlorure de sodium a la même action sur les chicorées.

Il y a donc des différences très nettes dans la résistance au champignon entre le topinambour, la carotte et la chicorée cultivés avec des engrais divers.

Chez la betterave à sucre, le maximum de résistance m'a paru se trouver dans la parcelle avec phosphate. Quant à la pomme de terre (Marjolin), je n'ai aperçu aucune différence entre les tubercules des 5 parcelles. Dans mes essais, ces deux dernières espèces se sont montrées fort peu favorables au développement du *Sclerotinia*, qui d'abord avait été cultivé sur le topinambour.

La virulence du *Sclerotinia Libertiana* s'exalte par des passages successifs sur le topinambour, et on ne voit plus bientôt de différence entre la résistance des tubercules qui ont été cultivés dans les diverses parcelles.

Aucune modification dans la virulence de ce champignon ne s'est manifestée à la suite de cultures dans la solution minérale employée précédemment (p. 8) à laquelle on avait ajouté les corps suivants :

Peptone..	1 0/0
Lactose...	2.5
Glycérine..	2.5
Tartrate de potassium............................	2.5

Après seize jours, la solution de tartrate était encore stérile. Dans la solution de peptone, il y avait de petits amas mycéliens distincts, assez étendus, produisant de petits sclérotes noirs à la surface du liquide.

Le mycélium dans la solution de lactose est continu, membraneux, vigoureux, avec de nombreux sclérotes gros et arrondis ; ils ont de 3 à 6 millimètres de diamètre.

Enfin, avec la glycérine, il s'est formé des amas mycéliens distincts, partiellement immergés sans sclérotes ; ceux-ci ont

commencé à apparaître le vingtième jour, mais étaient peu nombreux au bout d'un mois, tandis que le mycélium restait très filamenteux.

Des petites parcelles des mycéliums de ces trois cultures ont été inoculées à des topinambours ; elles se sont développées avec vigueur : on n'a relevé d'autre différence qu'une tendance du mycélium, d'abord cultivé dans la glycérine, à produire peu de sclérotes et à former de longs filaments.

Assez souvent, il y a, dans la pourriture mycélienne du topinambour, de la carotte et de la chicorée, symbiose du *Sclerotinia* et du *Bacillus coli communis*. Je m'en suis assuré en plongeant un fil de platine dans des tubercules infectés naturellement ou artificiellement lorsqu'ils sont ramollis ; le fil est ensuite passé à la surface de plaques de moût de bière gélatinisé et stérilisé. Fréquemment, on obtient d'abord des stries de colonies de *Bacillus coli*, puis quelques jours après des mycéliums de *Sclerotinia*.

Il ne faudrait pas en conclure que le champignon soit incapable d'attaquer lorsqu'il est seul les divers tubercules. Quand dans des topinambours, carottes, chicorées, navets, pommes de terre, on prend avec un emporte-pièce stérilisé des cylindres de tissus que l'on introduit aseptiquement dans des tubes stérilisés, on obtient rapidement, après ensemencement de fragments de mycélium bien purs, des végétations vigoureuses avec ramollissement des tissus, dissociation des cellules et contraction du protoplasme.

Ce sont les mêmes altérations que chez la pomme de terre inoculée avec du *Bacillus coli* virulent. Et il y a ici encore intervention d'une diastase (cytase) et d'un autre produit de sécrétion. De Bary [1] l'avait déjà observé, et montré que ce produit sécrété par le *Sclerotinia* est de l'acide oxalique, qui peut se trouver à l'état d'oxalate acide de potassium.

La cytase du *Sclerotinia* a été préparée en pressant des topinambours ramollis dans un linge ; le liquide exprimé est ensuite filtré à la bougie Chamberland. Il a une action très nette sur des morceaux de tubercules de topinambour, de carotte, de chicorée, sur les écailles de l'oignon cultivé, et surtout sur les tissus du navet ; l'action est moindre sur la pomme de terre et nulle

1. *Loc. cit.*, p. 419.

sur la betterave. D'abord, le protoplasme des cellules est contracté; deux heures suffisent à cette réaction. Puis, les lamelles moyennes se dissolvent, les cellules se séparent et les tissus s'amollissent. Tous ces phénomènes avaient bien été observés par de Bary.

Chauffé à 52°, le liquide perd toute action sur les membranes cellulaires, mais continue à provoquer la contraction du protoplasme. Cette modification, qui correspond à la perte de toute résistance à l'infection de la part de la matière vivante et la tue, est causée par l'acide oxalique. On peut l'obtenir avec des fragments de topinambour, de navet, d'oignon immergés dans des solutions d'acide oxalique à 0,5 0/0, ou d'oxalate acide de potassium à 1 0/0. Ces doses ont été calculées d'après l'acidité des sucs filtrés de tubercules de topinambour infectés, acidité qui dans mes essais variait entre 5 gr. 23 et 5 gr. 55 d'acide sulfurique par litre. Ce dernier chiffre m'a paru maximum.

Cette forte acidité est nécessaire pour le travail de la cytase du *Sclerotinia* cultivé sur le topinambour. En effet, les sucs neutralisés par la soude perdent toute action sur les membranes cellulaires, ce que de Bary avait bien constaté; mais ils continuent à provoquer la contraction du protoplasme, tout au moins chez l'oignon, la chicorée et le topinambour. Je n'ai plus observé cette contraction, lorsque les jus étaient alcalinisés légèrement.

Comme chez le *Bacillus coli communis* cultivé sur diverses espèces à tubercules, il y a des variations dans les sécrétions du *Sclerotinia* selon la nature des espèces attaquées. Ainsi, des racines de chicorée inoculées expérimentalement ont donné un suc qui, filtré à la bougie Chamberland, avait une acidité équivalente à 2 gr. 17 par litre. Tel quel, il avait une action énergique sur la pomme de terre, la chicorée et le navet, mais faible sur la carotte, le topinambour et l'oignon; le protoplasme était coagulé et les cellules dissociées.

Ces résultats ne se comprennent que si l'on admet des différences dans la résistance des lamelles mitoyennes, et aussi dans les substances consommées par le parasite et qui donnent lieu à la production de corps résiduaires de nature diverse.

La cytase du *Bacillus coli* cultivé sur pomme de terre est détruite par un chauffage pendant 5 minutes à 62°; pour celle

du *Sclerotinia* qui s'est développé sur le topinambour, il suffit de chauffer à 54° pendant le même temps.

Vraisemblablement, cette différence n'est pas causée par l'acidité du suc de topinambour malade : après neutralisation, le suc ne peut désagréger les tissus de la pomme de terre. Il faut donc supposer que les cytases produites dans les diverses espèces et par les divers parasites constituent des espèces distinctes.

Grâce à sa forte acidité, le suc de topinambour filtré à la bougie de porcelaine est très limpide, se conserve facilement sans altération, et il pourrait aisément servir à des recherches sur la cytase.

Les conditions dans lesquelles les cytases du *Bacillus coli* et du *Sclerotinia Libertiana* dissolvent les lamelles mitoyennes des cellules de la pomme de terre et du topinambour nous expliquent l'action si différente du superphosphate sur la résistance de ces deux espèces à tubercules. La cytase sécrétée dans la pourriture bactérienne expérimentale de la pomme de terre exige, pour son fonctionnement, un milieu alcalin, tout au plus légèrement acide. Celle du *Sclerotinia* ne peut dissocier les cellules du topinambour en milieu neutre, n'agit qu'en milieu acide, et est très active quand l'acidité est très élevée. Dans les cellules végétales, l'acide phosphorique se présente fréquemment à l'état de sels acides, plus solubles. L'absorption des phosphates doit donc augmenter l'acidité des sucs cellulaires.

XI

CONCLUSIONS ET RÉFLEXIONS

A l'état normal, le *Bacillus coli communis* n'est point parasite pour les plantes vivantes : il ne se développe ni sur la pomme de terre, ni sur le navet, ni sur d'autres plantes à tubercules ou non, considérées également dans des conditions normales. Cependant, on peut communiquer à ce microbe l'aptitude parasitaire, lui faire acquérir de la virulence par la culture sur des pommes de terre plongées pendant quelque temps dans des solutions alcalines, qui diminuent la résistance naturelle. Et alors, on voit la virulence s'exalter rapidement par des passages

successifs sur la même espèce de tubercules. Elle peut diminuer et disparaître par suite de la culture sur d'autres espèces, comme le passage de la pomme de terre sur le navet puis sur la pomme de terre ; il en est encore de même quand on cultive le microbe sur des milieux non vivants : tubercules tués, solutions organiques diverses.

Ainsi atténué, le microbe ne recouvre la virulence que sur des tubercules dont la résistance a été diminuée artificiellement, afin de rendre au microbe ses propriétés parasitaires.

Dans les cultures et sans doute aussi dans la nature, la diminution de résistance des végétaux pour leurs ennemis cryptogamiques est fréquente et doit être le point de départ de la transformation des êtres saprophytes en vrais parasites. Tel fut le cas pour les carottes et les pommes de terre cultivées en 1897 et 1898 dans la parcelle où de fortes doses de chaux avaient été répandues. La résistance naturelle des tubercules était affaiblie, au point que des germes du *Bacillus coli communis* et du *B. fluorescens putidus* répandus dans l'air ont pu attaquer les tissus vivants et donner des races nettement parasitaires.

Au contraire, les carottes et les pommes de terre qui avaient subi l'influence de doses élevées de sels de potasse, et surtout de phosphate, ont résisté plus ou moins complètement aux races de bacilles devenues parasites.

Chez le topinambour, les phosphates ont une action toute différente : ils prédisposent les tubercules à la pourriture provoquée par le *Sclerotinia Libertiana*.

Cette diversité d'action d'un même engrais s'explique sans difficulté. En effet, le travail de pénétration des parasites végétaux exige l'intervention de diastases qui dissolvent les lamelles mitoyennes des cellules végétales, diastases qui varient chez la pomme de terre attaquée par le colibacille et chez le topinambour envahi par le *Sclerotinia*. L'une fonctionne le mieux en milieu nettement acide, l'autre en milieu alcalin. Les divers composés chimiques, organiques ou non, qui existent dans les cellules des plantes, donnent sous l'influence des parasites des corps résiduaires à réactions variables ; ceux-ci réagissent sur la dissolution des lamelles mitoyennes et par conséquent sur la marche de la maladie.

Dès lors, il est facile de comprendre comment la nature du

sol et la composition des engrais influent nécessairement sur la résistance des plantes à leurs parasites.

Des faits de cet ordre ont été bien démontrés pour la pomme de terre, la carotte, le topinambour et la chicorée, mais encore, chez la première de ces espèces, en ce qui concerne la résistance au *Phytophthora infestans*. Et on peut espérer que des recherches nouvelles montreront qu'il en est ainsi dans toutes les maladies cryptogamiques des végétaux.

La culture, déjà si intensive à l'époque actuelle dans les pays très peuplés, le deviendra plus tard encore davantage. Les substances minérales qui sont nécessaires à la vie des plantes, surtout les phosphates et les sels de potasse, nous semblent ne devoir être épuisées que dans un avenir lointain. L'agriculture n'aura pas sans doute à s'en préoccuper d'ici à plusieurs siècles. Mais elle est menacée d'un danger plus redoutable : l'extension continue des parasites, particulièrement des maladies cryptogamiques, par suite de l'évolution de certains saprophytes.

La variabilité des fonctions chez les organismes inférieurs, leur adaptation graduelle à la vie parasitaire, ne sont aujourd'hui plus contestables. La culture intensive avec ses conséquences fatales, répétition des mêmes plantes sur le même sol, l'emploi d'engrais abondants, qui ne sont pas toujours bien appropriés aux besoins immédiats des plantes, constitue une cause permanente d'infection. Pour préserver les champs cultivés des épidémies meurtrières ainsi occasionnées par des organismes ubiquistes, dont la destruction est impossible, il faudra recourir à des procédés fondés sur l'influence de l'alimentation minérale dans la résistance des plantes à leurs parasites. C'est une voie nouvelle pour la pathologie végétale.

ÉTUDE SUR L'IMMUNITÉ VIS-A-VIS DES COMPOSÉS ARSÉNICAUX

PREMIER MÉMOIRE

DU ROLE DES LEUCOCYTES DANS L'INTOXICATION
PAR UNE COMBINAISON SULFURÉE D'ARSENIC

Par le Dr BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Née en zoologie, la phagocytose s'est bientôt transportée sur le terrain de la pathologie, où elle domine en ce moment l'immense question de l'immunité.

Elle semble entrer aujourd'hui dans une nouvelle phase : tout en continuant à relever du domaine de la zoologie et de la médecine, c'est au chimiste maintenant qu'elle nous semble réserver ses révélations.

Par le présent travail, conçu dans le sens bio-chimique, nous n'avons pas d'autre prétention que de prendre, pour ainsi dire, acte de cette nouvelle phase de la phagocytose, en posant quelques jalons sur la voie qui pourra amener un jour à l'étude chimique de l'immunité.

Jusqu'ici, en pathologie, les phénomènes phagocytaires étaient surtout étudiés sur les microbes, et le développement de la théorie, en effet, marchait de pair avec le progrès de la microbiologie.

Quelque évident que parût l'acte phagocytaire, celui-ci souleva cependant au début une tempête d'objections, et cela parce que les deux facteurs en cause, leucocytes et microbes, et surtout le second, étant des êtres vivants, sont sujets à des changements biologiques peu perceptibles au microscope, et en général difficilement accessibles à l'analyse.

Il était de toute évidence qu'en substituant à des microbes

une substance également toxique, mais non vivante, on pouvait simplifier notablement la question.

***

La substance choisie comme agent toxique, le sulfure d'arsenic, l'a été pour deux raisons principales : d'abord à cause de son pouvoir toxique élevé, puis à cause de sa couleur, qui permet d'en déceler les moindres traces dans l'organisme ; de plus, grâce à la nature chimique de ce corps, il est possible de suivre son sort dans les organes, même longtemps après qu'il a cessé d'être visible au microscope — avantage dont on est dépourvu quand il s'agit des microbes.

La combinaison sulfurée que nous avons employée est une substance qui, à notre connaissance, n'a pas encore été décrite.

Nous nous réservons d'en faire une étude chimique complète; pour le moment, bornons-nous à en indiquer le mode de préparation.

On prépare d'abord le trisulfure d'arsenic en faisant passer un courant d'hydrogène sulfuré dans une solution chlorhydrique d'anhydride arsénieux ; ce trisulfure est, comme on le sait, une poudre d'un beau jaune clair, très soluble dans l'ammoniaque.

Si on ajoute à ce trisulfure jaune un peu d'ammoniaque, beaucoup moins qu'il n'en faut pour le dissoudre, et si l'on évapore le mélange à sec au bain-marie, on obtient un corps d'un rouge orangé, difficilement soluble dans l'ammoniaque ; c'est cette substance qui nous a servi au cours de toutes nos expériences.

La quantité de soufre et d'arsenic que contient ce corps correspond à la formule du trisulfure d'arsenic ; mais, ainsi préparé, il contient en plus une toute petite quantité d'azote, provenant probablement d'un peu de sulfhydrate d'ammoniaque, dont il est difficile de l'en débarrasser ; nous désignerons ce nouveau corps, jusqu'à nouvel ordre, sous le nom de *trisulfure rouge d'arsenic,* pour le distinguer du trisulfure jaune bien connu.

Dans le cours de ce travail, nous nous sommes toujours servi de notre trisulfure en suspension aqueuse ; l'animal d'expériences a été le cobaye : le lieu d'injections, la cavité péritonéale.

Etant donnée l'extrême sensibilité du cobaye aux moindres

variations dans la quantité du sulfure injecté, il a fallu établir un dosage des plus précis. Cela ne paraît pas au premier abord être une besogne facile, mais on y arrive à coup sûr quand on est prévenu des écueils à éviter.

Voici comment nous procédons. Le précipité est finement trituré et séché ; nous en prélevons très exactement 5 centigrammes, lesquels, transportés dans un verre à pied stérile, sont additionnés de deux ou trois gouttes d'eau ; on triture de nouveau le mélange de trisulfure et d'eau avec une baguette en verre jusqu'à ce qu'on obtienne une masse homogène (l'eau ne mouille que difficilement le sulfure,et si on ajoute beaucoup d'eau à la fois, il est impossible d'obtenir une répartition égale du précipité) ; c'est alors que l'on ajoute le reste de l'eau (20 c. c. pour 5 centigr.) assez rapidement, tout en agitant le mélange avec la baguette. On obtient ainsi une émulsion parfaitement homogène dont chaque centimètre cube contient une quantité déterminée de sulfure, dans notre cas c'est 0,0025 pour 1 c. c. Aussitôt l'émulsion préparée il faut passer aux inoculations ; celles-ci doivent être faites aussi rapidement que possible ; pendant la durée de l'opération, l'émulsion doit être continuellement agitée pour empêcher les quelques grains de sulfure de tomber au fond du verre.

Avec un peu d'habitude, on parvient de la sorte à doser exactement le trisulfure en suspension, ce qui peut d'ailleurs être facilement vérifié : les animaux de même poids ayant reçu la même dose d'émulsion succombent au bout d'un nombre d'heures presque toujours le même.

Disons ici, d'une façon générale, qu'en faisant l'étude des composés arsénicaux, on ne saurait être trop méticuleux pour ce qui concerne le dosage de la substance injectée.

Qu'il s'agisse de l'intoxication par le sulfure ou un autre sel d'arsenic, il n'y a guère de période d'incubation, comme c'est le cas pour la toxine diphtérique, par exemple : quelle que soit la dose de cette dernière, on n'arrive pas à tuer un lapin en moins de 24 heures. Il n'en est pas de même avec les sels d'arsenic : si une dose tue l'animal en 48 heures, il suffit de l'augmenter d'une fraction, d'un cinquième, par exemple, pour que la mort d'un animal de même poids survienne déjà au bout de 10 heures ; en doublant la dose on tue en 2-3 heures.

Les animaux de même poids se montrent donc très sensibles vis-à-vis de très petites variations dans la quantité du poison.

Cela revient à dire que les animaux de même espèce, mais de poids différents, réagissent différemment vis-à-vis d'une même dose d'arsenic : il s'ensuit donc que si on a intérêt à retarder la mort de 24 ou 48 heures, ce n'est pas *une* dose mortelle qu'il faut établir, mais une série de ces doses correspondantes aux différents poids d'animal de même espèce.

C'est là un inconvénient qui ne se présente pas, au même degré, au moins, avec les toxines microbiennes : mais en revanche, la dose mortelle une fois déterminée pour un certain poids d'animal, on peut régler la mort avec une précision presque mathématique. avantage qui nous a été très précieux au cours de cette étude.

Pour bien préciser la dose mortelle d'un composé arsénical, il est de toute nécessité, outre le poids d'animal, de faire entrer en compte le temps dans lequel l'animal meurt. Ainsi, pour donner l'idée de la toxicité de notre sulfure d'arsenic en suspension aqueuse (5 centigr. de sulfure pour 20 c. c. d'eau), nous dirons que 3.5 c. c. de cette émulsion, ou 0,0087 de sulfure tuent un cobaye de 350 grammes en 45 heures.

*
* *

Injectons à un cobaye, dans la cavité péritonéale, une dose non mortelle de trisulfure d'arsenic, et faisons de temps à autre des prises d'exsudat péritonéal.

Quelle que soit la dose du poison, alors même que le liquide injecté a la température du corps de l'animal, on constate immédiatement une diminution notable des leucocytes ; ceux-ci, extrêmement nombreux, comme on le sait, à l'état normal, deviennent tout d'un coup rares, et ceci dès les premiers moments qui suivent l'injection.

Cette hypoleucocytose péritonéale n'est point due au choc causé par l'injection (comme cela se produit lors de l'injection des poudres inertes comme du carmin), car elle a une certaine durée, et elle est d'autant plus grande que la dose du sulfure a été plus forte.

Cette hypoleucocytose, caractérisée surtout par la persistance des petits lymphocytes, peut durer jusqu'à 10-12 heures, après

quoi on voit des leucocytes apparaître de nouveau dans le liquide péritonéal ; cet afflux se fait d'une façon continue et progressive : l'exsudat, de limpide qu'il était, devient louche, épais : une hyperleucocytose intense se produit ; le contenu péritonéal n'est en ce moment qu'une bouillie leucocytaire.

Le stade d'hyperleucocytose a une durée variable suivant les cas. Plus l'animal a été éprouvé, plus l'hyperleucocytose persiste.

Au bout de 2 ou 3 jours en moyenne, tout rentre habituellement dans l'ordre : l'exsudat récupère sa limpidité primitive, le nombre des leucocytes retombe à peu près au taux normal, et l'animal, qui était mal à son aise les premiers temps, retrouve l'appétit et la vivacité de ses meilleurs jours.

Voici pour les leucocytes.

Avant d'examiner la cause qui préside à ces variations, voyons ce que devient pendant ce temps le trisulfure d'arsenic une fois arrivé dans le péritoine.

Déjà un quart d'heure après l'injection, quand on retire une goutte d'exsudat, on peut trouver dans différents champs microscopiques un ou plusieurs leucocytes contenant dans leur intérieur une substance jaune rougeâtre de forme irrégulière, sur la nature de laquelle il est impossible de se méprendre : ce sont bel et bien les grains du trisulfure d'arsenic devenu la proie des phagocytes ; à côté d'eux, on voit une quantité considérable d'autres grains, réunis en masses volumineuses, de même couleur, flottant en liberté dans l'exsudat, et frôlant impunément les petits lymphocytes, incapables de faire acte de phagocytose.

Cet état de choses peut durer une heure aussi bien qu'un jour et plus ; tout dépend de la dose injectée et de la résistance de l'animal, et à cet égard la règle ne souffre pas d'exception : tant que l'animal est en danger de mort et n'a pas franchi le moment au delà duquel la guérison est certaine, la phagocytose est insignifiante ou presque nulle.

Si l'animal ne peut pas résister au trisulfure, le tableau que nous venons de tracer persiste ou va en s'accentuant à mesure que la mort approche : les leucocytes deviennent très rares dans l'exsudat, et ceux qui contiennent le trisulfure le deviennent encore plus.

Lorsque la mort ne survient pas rapidement et que l'animal

résiste pendant plusieurs jours, on constate à certains moments des poussées aiguës de phagocytose; mais celles-ci alternent avec des phases pendant lesquelles les phagocytes, incapables probablement de fonctionner comme tels, laissent échapper de leur protoplasma des grains déjà englobés, et accélèrent de la sorte le dénouement fatal.

Mais l'aspect de l'exsudat change du tout au tout, si c'est l'animal qui triomphe du sulfure: ce changement, qui se fait progressivement, devient très accusé dès que l'animal entre franchement dans la voie de guérison; c'est alors que l'on assiste à un de ces spectacles dont seule la nature possède le secret: l'exsudat fourmille de leucocytes; à côté des polynucléaires, on voit surtout de beaux macrophages vigoureux, bien mobiles, dont la plupart sont remplis des corpuscules rouges du trisulfure; on aurait beau chercher des corpuscules libres, on n'en trouverait pas un seul; l'acte phagocytaire est à son apogée; il ne peut pas être plus parfait.

En ce moment l'animal est complètement rétabli, et rien dans son extérieur ne trahit les phénomènes importants qui se déroulent dans son péritoine.

Plus l'animal a mis de temps à arriver à cette période, plus est longue la durée de cette crise phagocytaire.

D'ordinaire, déjà le surlendemain on aperçoit une diminution sensible des leucocytes à corpuscules rouges; cette diminution va en progressant jusqu'à la disparition complète du trisulfure de l'exsudat; celui-ci reprend alors sa constitution normale.

Souvent même, le dixième jour après l'injection, on constate encore dans l'exsudat des phagocytes bourrés d'arsenic; mais au delà du douzième jour nous n'en avons jamais trouvé, même si la dose a été très près de la dose mortelle.

*
* *

En présence de ces faits, il est naturel de se poser les questions suivantes : 1° quelle est la signification du processus phagocytaire; 2° quel est le sort du trisulfure dès qu'il cesse d'être vu au microscope, et, 3° quel est en général le mécanisme d'intoxication par cette substance?

Tous ces problèmes, en apparence étrangers l'un à l'autre, se trouvent en réalité intimement liés entre eux, et à tel point

qu'il est impossible d'en aborder un, sans empiéter sur les autres.

Commençons par étudier le mécanisme de l'intoxication. Inexplicable au premier abord, ce mécanisme devient extrêmement simple, dès qu'on réussit à se dégager de la notion courante en chimie, en vertu de laquelle les sulfures d'arsenic sont insolubles dans l'eau.

En réalité, cette notion n'est pas exacte ; le fait est que le trisulfure est très difficilement soluble. Insignifiante au point de vue de la grosse chimie, cette nuance acquiert une importance considérable lorsqu'on se place sur le terrain toxicologique : la valeur des phénomènes change dès qu'on opère avec des réactifs aussi sensibles que les cellules, et qu'on tient compte d'un nouveau facteur qui est le temps ou la durée de la réaction.

Il suffit que l'attention soit portée sur ce sujet pour que l'on trouve en abondance des preuves que le trisulfure ne doit sa toxicité qu'à sa propriété de devenir soluble.

En voici une : préparons avec des quantités égales de notre sulfure deux émulsions, une très fine, l'autre contenant de grosses particules ; si la dose de trisulfure est choisie telle qu'en émulsion fine elle tue un cobaye en 35-40 heures, la seconde émulsion, bien que contenant la même dose de sulfure, ne tuera pas un cobaye du même poids.

En d'autres termes, plus on favorise la solubilisation du sulfure dans la cavité péritonéale — par la trituration préalable — plus l'émulsion devient toxique.

Nous possédons un autre moyen, encore plus sûr, qui permet de nous assurer que le trisulfure est susceptible de se dissoudre dans le liquide péritonéal ; c'est le procédé des sacs.

Enfermons dans un sac en moelle de roseau une forte dose de sulfure, une dose pouvant déterminer la mort dans quelques heures ; ajoutons-y un peu d'eau et plaçons le tout, après avoir bien fermé le sac, dans la cavité péritonéale d'un cobaye ; il va sans dire que toutes les opérations exigent une asepsie rigoureuse. Tout de suite après l'opération, l'animal se met à manger ; mais déjà, une demi-heure après, il est manifestement malade : le poil se hérisse, il devient immobile, et il meurt 3 ou 4 heures après l'opération, c'est-à-dire presque aussi rapidement que si la même dose d'arsenic lui avait été injectée directement dans le péritoine.

Introduisons maintenant dans un sac une quantité de sulfure qui, étant injectée directement, ne peut pas déterminer la mort.

Dans ce cas aussi, le cobaye ne tarde pas à mourir, ordinairement au bout de 5 à 7 jours. A l'autopsie on trouve le sac intact, mais contenant beaucoup moins de trisulfure que l'on n'en a mis. Le sang est stérile.

Il est évident que la mort est due au trisulfure passé en solution, et ayant diffusé à travers les parois du sac, la toxicité du trisulfure dissous étant beaucoup supérieure (trois fois environ) à celle du précipité injecté directement dans le péritoine.

Ces expériences avec les sacs sont de nature à répondre à la fois à deux questions que nous nous sommes posées, et qui visent le mécanisme de l'intoxication d'une part, et le rôle du processus phagocytaire, de l'autre.

En effet, les conclusions que comportent ces expériences sont nettes : elles prouvent d'un côté que dans la cavité péritonéale le trisulfure agit et tue en se dissolvant ; d'autre côté, elles nous font saisir l'importance de l'intervention leucocytaire en nous montrant l'effet de la non-intervention.

Sans entrer dans des détails sur ce dernier point, sur lequel nous reviendrons plus tard, continuons l'étude de la solubilité du trisulfure d'arsenic.

Au cours de nos expériences, il nous est arrivé de nous servir d'une même émulsion de sulfure à 24 heures d'intervalle, et nous avons été fort surpris de voir la toxicité de l'émulsion notablement augmentée le lendemain de sa préparation.

Toutes causes d'infection devant être écartées, il a fallu admettre que le trisulfure peut passer à l'état soluble aussi *in vitro*, ce qui a été confirmé par l'analyse chimique.

Une émulsion préparée la veille avait été filtrée; le liquide ainsi obtenu, limpide et incolore, a été divisé en deux portions : une, soumise à l'évaporation lente, a donné un résidu jaunâtre; l'autre portion, mise dans l'appareil de Marsh, a donné un superbe anneau d'arsenic métallique.

Le trisulfure est donc soluble non seulement *in vivo*, mais également *in vitro*.

Voilà pourquoi il est nécessaire, dans l'intérêt de la précision du dosage, de faire usage de l'émulsion aussitôt qu'elle est préparée ; c'est aussi pourquoi, en préparant l'émulsion, il faut tenir

compte non seulement de la quantité d'arsenic employé, mais encore de celle d'eau additionnée.

*
* *

Maintenant, la solubilité du sulfure établie, nous pouvons pousser plus loin l'analyse des phénomènes accompagnant l'inoculation, et mieux nous rendre compte du mécanisme de l'intoxication.

Quelle que soit la dose injectée, avons-nous dit, on observe d'abord une hypoleucocytose qui, tantôt persiste jusqu'à la mort, tantôt cède la place à un stade hyperleucocytaire avec phagocytose intense, si l'issue est favorable.

Ces variations leucocytaires ne sauraient maintenant nous embarrasser : il se passe avec le trisulfure ce qui se passe avec tous les microbes pathogènes ou avec leurs toxines.

En effet, quand on introduit le trisulfure dans la cavité péritonéale, une partie en passe en solution, et ce trisulfure soluble provoque une chimiotaxie négative vis-à-vis des leucocytes présents, d'où hypoleucocytose.

Si la quantité du trisulfure dissous est si considérable que les leucocytes ne peuvent pas s'y habituer, ceux-ci ne reviennent plus ; en vertu de la chimiotaxie négative, ils s'installent définitivement au lieu de leur refuge. Les leucocytes sont bien sauvés, mais l'animal succombe ; et cela parce que, les leucocytes ayant abandonné le champ de bataille qui est la cavité péritonéale, le trisulfure a toute la liberté voulue pour continuer à s'y dissoudre sans aucune entrave.

A l'autopsie on trouve les lésions caractéristiques propres à tous les composés arsénicaux solubles : on constate, par-ci, par-là, dans la cavité péritonéale, des amas jaune rouge de trisulfure bien visibles à l'œil nu : ceux-ci sont libres ou bien disposés le long de la grande courbure de l'estomac. La présence de ces amas ne doit pas nous étonner, bien que nous attribuions la mort à la dissolution du trisulfure ; le fait est que pour tuer l'animal, il n'est pas du tout nécessaire que tout le trisulfure injecté passe en solution; il suffit qu'un tiers ait eu le temps de se dissoudre pour que l'animal puisse en mourir, vu le pouvoir toxique du sulfure soluble.

*
* *

Prenons maintenant le second cas : la dose injectée est inférieure à la dose mortelle.

L'hypoleucocytose, après un certain laps de temps, plus ou moins long suivant la dose, est remplacée par une hyperleucocytose, et celle-ci n'est pas seulement caractérisée par l'afflux considérable des leucocytes, mais en plus, et ce qui explique tout, par une phagocytose aussi parfaite que possible.

Dans ce cas, comme dans le cas précédent, une partie du trisulfure parvient à se solubiliser, ce qui détermine une chimiotaxie négative, mais la quantité du trisulfure soluble n'étant pas aussi considérable que dans le premier cas, les leucocytes finissent par s'y habituer au bout d'un certain temps, ils deviennent positivement chimiotactiques : c'est précisément à ce moment-là que la dissolution ultérieure du trisulfure dans le liquide ambiant vient à être arrêtée ; les leucocytes accourus emprisonnent dans leur protoplasma le trisulfure restant : ils l'empêchent ainsi matériellement de sortir de l'enceinte péritonéale pour aller toucher aux éléments sensibles, telles que les cellules nerveuses, par exemple.

Tel est le mécanisme de l'intoxication, examiné de près, microscope en main.

*
* *

Tout en restant sur le terrain solide des faits, nous sommes amenés forcément à établir un lien intime entre l'effet final de l'inoculation et les phénomènes phagocytaires : en cas de phagocytose franche, l'animal est sauvé, tandis qu'une abstention des leucocytes le tue.

On peut maintenant s'expliquer la différence d'effets toxiques suivant que l'on injecte le trisulfure solide ou liquide.

Au premier abord, on aurait pu penser que cette différence tient à la rapidité d'élimination du trisulfure solide ; mais les expériences sont là pour prouver le contraire.

Déjà l'examen microscopique suffit pour s'assurer de sa présence dans les leucocytes de l'exsudat péritonéal pendant 10 jours et quelquefois plus ; ensuite, si au bout de ce temps on sacrifie l'animal, on voit encore le trisulfure dans les différents feuillets péritonéaux : enfin l'analyse chimique montre que l'élimination

du trisulfure injecté à l'état solide se fait aussi lentement que pour le trisulfure liquide.

L'hypothèse basée sur la rapidité d'élimination est donc à rejeter.

Il ne reste qu'une seule interprétation qui est celle-ci : si le trisulfure solide injecté dans le péritoine ou dans les veines se montre trois fois moins toxique que le trisulfure soluble, cela tient uniquement à ce que dans le premier cas il y a intervention phagocytaire, qui est beaucoup moins prononcée dans le second cas.

En d'autres termes, cette différence de toxicité, présentée par la même substance dans des conditions différentes, permet d'évaluer approximativement le pouvoir antitoxique de l'appareil phagocytaire ; ce pouvoir est tel qu'il préserve l'animal contre une dose environ trois fois mortelle, c'est-à-dire contre une dose qui l'eût tué en quelques heures.

*
* *

Il était intéressant de savoir si les phagocytes avalaient le sulfure comme ils le font de tout corps étranger se trouvant à leur portée, ou bien s'ils étaient capables de sélection.

En injectant à des cobayes, dans la cavité péritonéale, simultanément de la poudre de carmin et du trisulfure, à chaque prise d'exsudat on a pu constater ceci : à côté des rares leucocytes contenant dans leur intérieur de corpuscules jaune rouge de trisulfure, il s'y trouvait des nombreux leucocytes qui étaient bourrés des corpuscules rouges de carmin; les mêmes phénomènes avaient lieu quand le trisulfure avait été injecté d'abord et le carmin quelque temps après. Il est donc évident que les leucocytes sont capables de faire une sélection.

*
* *

L'ensemble des faits qui viennent d'être relatés serait largement suffisant pour se faire un jugement sur le rôle joué par les leucocytes dans la lutte contre le trisulfure. Mais, vu l'importance du sujet, nous avons cru qu'il ne serait pas superflu d'apporter d'autres faits à l'appui.

Si, comme nous l'affirmons, le système leucocytaire a véritablement pour fonction la défense de l'organisme, il doit exister

entre ces deux éléments, leucocytes et résistance de l'organisme, un rapport tel qu'en faisant varier le nombre des leucocytes, on devrait en apercevoir l'effet sur l'efficacité de la défense.

Le problème qui se posait devant nous consistait donc en ceci : parvenir à diminuer ou à augmenter le nombre naturel des leucocytes, afin d'évaluer ensuite la résistance respective de l'animal dans l'un et l'autre cas.

Nous avons cherché d'abord un procédé pour diminuer les ressources leucocytaires naturelles du péritoine; malheureusement, il n'en existe pas un seul qui soit bon, car toutes les substances qui déterminent une hypoleucocytose plus ou moins durable sont toxiques. Ces procédés sont évidemment contre-indiqués, parce qu'en constatant une moindre résistance de l'animal, on ne saurait à quoi l'attribuer, au fait de l'hypoleucocytose ou bien à la substance surajoutée.

Pour obvier à cette difficulté, nous avons eu recours à un subterfuge que voici : tout en maintenant le nombre normal des leucocytes, nous avons diminué leur pouvoir phagocytaire en injectant préalablement du carmin dans le péritoine.

Cette poudre inoffensive est aussitôt englobée par les leucocytes, qui finissent par s'en charger à tel point que beaucoup d'entre eux ne laissent plus voir la moindre parcelle de protoplasma libre. C'est à ce moment, ou même 24 heures après, l'animal étant en parfaite santé, que nous injectons du trisulfure.

Les leucocytes bourrés de carmin restent en majorité complètement indifférents à cette nouvelle injection; il y en a qui, n'ayant pas englobé le carmin, phagocytent le trisulfure; il y en a enfin qui, n'étant pas bourrés de carmin, gardent encore de la place pour le trisulfure; mais ces deux catégories de leucocytes ne représentent que la minorité.

Le trisulfure injecté se trouve donc, dans notre cas, dans des conditions identiques à celles que l'on aurait si on disposait d'un moyen de déterminer une hypoleucocytose vraie.

Eh bien, l'expérience montre que dans ce cas la résistance de l'animal est notablement amoindrie; si pour tuer un cobaye neuf en 48 heures il faut 4 c. c. de l'émulsion arsénicale, pour déterminer le même effet chez le cobaye ayant reçu du carmin, il suffit d'en injecter 3,5 c. c. ou même 3 c. c., dose qui serait

inoffensive dans les conditions ordinaires. Il en résulte donc que là où l'intervention phagocytaire est paralysée, l'animal meurt de la dose que le témoin du même poids supporte très bien.

*
* *

Il nous reste maintenant à voir si, en augmentant artificiellement le nombre de leucocytes dans la cavité péritonéale, on parvient à renforcer la résistance de l'animal, et à lui faire supporter une dose qui serait mortelle dans des conditions ordinaires.

Cette expérience, très facile à faire quand il s'agit des microbes, des vibrions cholériques, par exemple, ne nous réussissait pas au début quand nous cherchions à l'appliquer au trisulfure.

La raison de notre insuccès est bien simple.

Quand on fait une préparation colorée de l'exsudat péritonéal dans la période phagocytaire, on est tout de suite frappé de l'affinité spécifique qui existe entre le trisulfure et les mononucléaires. Il n'y a que les gros macrophages de la cavité péritonéale qui contiennent des grains rouges, tous les autres — lymphocytes et polynucléaires — n'en contiennent guère ou extrêmement peu. Les seuls arsénicophages véritables (pour le trisulfure) sont donc les gros mononucléaires.

Or, il est évident que comme toutes les substances — eau physiologique, bouillon, aleurone, etc., — qui servent à préparer l'animal, amènent exclusivement une hyperleucocytose polynucléaire, ou, comme nous disons, une polynucléose, cette dernière reste tout à fait inefficace vis-à-vis du trisulfure, et pour en avoir raison il faut amener des mononucléaires. Là précisément est la grosse difficulté : autant il est facile de provoquer une polynucléose dans la cavité péritonéale, autant il est difficile d'obtenir une mononucléose, c'est-à-dire une hyperleucocytose faite aux dépens des mononucléaires.

On peut cependant y parvenir. Il est vrai que la mononucléose que nous obtenons n'est pas d'une richesse comparable à celle de la polynucléose, mais elle est suffisante pour le but que nous nous proposons.

En effet, nous avons remarqué que la polynucléose que l'on crée artificiellement par différentes substances est suivie d'une

crise mononucléaire, caractérisée par la présence d'un grand nombre de gros macrophages ; ceux-ci, appelés très probablement dans le liquide péritonéal par les polynucléaires, se présentent sous deux aspects : tantôt ils contiennent dans leur intérieur un, deux ou plusieurs leucocytes polynucléaires, tantôt ils y nagent complètement libres.

Pour que l'expérience réussisse, il faut avoir recours à des macrophages libres, dont les ressources phagocytaires n'ont pas été épuisées.

De nombreux essais faits avec différentes substances nous ont montré que les plus favorables à cet égard sont l'hémoglobine et la pilocarpine à très faible dose (1/8 milligr. environ) ; de même nous avons obtenu à plusieurs reprises une mononucléose considérable en faisant simplement une laparotomie, dans des conditions d'asepsie parfaite, cela va sans dire ; dans ce cas, le péritoine, excité par l'opération, fournit un exsudat abondant et riche en macrophages.

Par contre, les exsudats obtenus dans les conditions indiquées par le bouillon et surtout par l'émulsion d'aleurone, si souvent employée, ne se prêtent pas à notre expérience ; les macrophages, bien que présents dans l'exsudat dans ces cas, ne sont pas libres ; occupés à phagocyter les polynucléaires, ils se montrent moins avides du trisulfure.

Il est donc important de bien choisir le moment où les mononucléaires sont à leur maximum, ce qui a généralement lieu 40 à 48 heures après l'injection.

Alors il est facile de s'assurer que l'animal présente une résistance supérieure à celle qu'il a à l'état normal, et ceci malgré la pilocarpine qui est une substance toxique, ou malgré la laparatomie qui devrait plutôt amoindrir sa résistance naturelle. Un cobaye ainsi préparé survit parfaitement à la dose qui tue le témoin du même poids en 48 heures environ ; quand la mort survient plus rapidement sur le témoin, on n'a qu'une survie sur l'autre ; par contre, l'expérience réussit d'autant mieux que la dose injectée tue dans un délai plus long, au bout de trois jours, par exemple.

La différence entre le cobaye neuf et l'animal préparé est bien mise en relief lorsqu'on chauffe préalablement l'émulsion à 38° : tandis que chez le cobaye préparé la phagocytose s'établit

assez rapidement, le cobaye neuf traverse d'abord une période hypoleucocytaire avec les caractères qui ont été décrits plus haut.

*
* *

Jusqu'ici nous nous sommes occupés du mécanisme de l'intoxication et du rôle qui y appartient aux leucocytes. Pour compléter l'histoire toxicologique du trisulfure, il nous faut suivre son sort jusqu'à son élimination complète de l'organisme.

Nous l'avons laissé à l'intérieur des leucocytes; là, avons-nous dit, on l'observe pendant 10-12 jours au plus; que devient-il lorsqu'il cesse d'être visible?

Il est fort probable que pendant son séjour à l'intérieur des phagocytes le trisulfure se transforme en un composé soluble.

En effet, quand on suit de jour en jour l'exsudat d'un cobaye ayant présenté une forte phagocytose, on observe une série de modifications s'accentuant au fur et à mesure qu'on s'éloigne du moment de l'inoculation.

Au début de la période phagocytaire, les masses rouge jaune de trisulfure se trouvant à l'intérieur des phagocytes sont généralement uniques, de dimensions considérables, et occupent le centre des leucocytes; plus tard le tableau change : à côté des rares leucocytes ayant conservé leur caractère primitif, on s'aperçoit que la grande majorité contient dans son intérieur non plus un seul, mais plusieurs corpuscules; ceux-ci sont de petites dimensions, de forme plus régulière et sont situés surtout à la périphérie du leucocyte.

Ces changements font croire à une désagrégation de la masse de trisulfure primitivement englobée, dont les corpuscules désagrégés, réduits en miettes, finissent par se dissoudre dans le protoplasme même du leucocyte.

Quelle est la composition chimique de ce produit soluble? Est-ce simplement le trisulfure qui a passé en solution, comme nous l'avons vu le faire dans le liquide péritonéal, quand il est à l'abri des leucocytes; est-ce un nouveau composé arsénical formé aux dépens du contenu leucocytaire et rendu moins toxique pour l'organisme ?

Entre ces deux hypothèses, nous n'hésitons pas à nous ranger à la seconde, et voici pourquoi :

Si le rôle des leucocytes se bornait seulement à retarder la

solubilisation du trisulfure, l'animal succomberait ou au moins tomberait malade une fois la phagocytose terminée. La lenteur de la solubilisation n'empêcherait guère l'animal d'en être fortement incommodé et même d'en mourir, vu le pouvoir toxique du trisulfure soluble.

En réalité c'est précisément le contraire qui arrive. Dès que la phagocytose s'établit franchement, la guérison de l'animal est assurée : l'animal va de mieux en mieux à mesure qu'elle progresse, et quand elle est à sa fin, il ne présente plus la moindre trace de maladie.

Ces faits sont donc en complète contradiction avec la première hypothèse; par contre ils cadrent bien avec la seconde.

L'englobement ne constitue donc pas tout l'acte phagocytaire; celui-ci a, d'après nous, une portée biologique plus profonde.

L'acte essentiel de la phagocytose ne commence que l'englobement terminé, et ce qui nous le fait croire, c'est que *la substance toxique cesse de l'être après le passage à travers le corps des leucocytes* : nous pouvons dire que le poison y a subi une action phtérotoxique ou une sorte de digestion intracellulaire, et en le disant nous n'avons pas d'autre intention que de constater le fait, sans rien préjuger de sa nature intime.

*
* *

Quelles que soient les modifications que subit le trisulfure dans l'intérieur des phagocytes, toujours est-il que l'arsenic reste comme partie intégrante du nouveau composé; grâce aux procédés d'analyse chimique très précis, il est possible de retrouver les traces de son passage à travers les différents organes avant son élimination définitive.

Après avoir injecté à une série de cobayes des doses non mortelles du trisulfure, nous les avons sacrifiés à différents stades d'intoxication; nous avons pu de la sorte nous faire une idée de la répartition de l'arsenic dans les organes et des voies de son élimination.

Les résultats de l'analyse peuvent être ainsi résumés :

1° L'élimination de l'arsenic est presque nulle les premiers jours qui suivent l'injection;

2° Elle ne commence à se produire qu'au déclin de la pha-

gocytose, alors que le nombre des leucocytes à trisulfure est sensiblement diminué;

3° L'élimination est lente et se fait par les reins ;

4° A différents moments de l'intoxication on constate la présence de l'arsenic, bien qu'en quantités minimes, dans le foie et la rate ; on n'en trouve pas dans le canal digestif [1].

La recherche de l'arsenic dans les organes demande une série de manipulations préalables, ayant pour but la destruction des matières organiques.

C'est au cours de cette destruction, opération assez délicate, que l'on risque le plus de perdre de l'arsenic, ou de ne pas en trouver du tout, si on a affaire à de très petites quantités.

Après une étude comparative de divers procédés de destruction, nous nous sommes finalement arrêtés à celui proposé par M. Ogier qui, exécuté avec soin, réduit les pertes d'arsenic à des proportions aussi minimes que possible.

*
* *

Avant de passer à la récapitulation des points principaux de ce travail, nous croyons utile de souligner un fait d'ordre général qui se dégage de toute cette étude.

Une des objections les plus importantes contre la doctrine phagocytaire était que les phagocytes peuvent englober seulement les microbes atténués dans leur virulence par l'action préliminaire des humeurs.

Or, pour ce qui concerne le trisulfure d'arsenic, cette hypothèse est naturellement insoutenable ; il ne saurait venir à l'esprit de personne que le trisulfure puisse subir une atténuation quelconque.

Nos expériences avec les sacs en moelle de roseau prouvent d'ailleurs que les humeurs n'exercent aucune influence sur le trisulfure, puisque tous les animaux meurent intoxiqués dans ces conditions.

Or, si le leucocyte est capable d'englober, sans préparation préalable, une substance aussi toxique que le trisulfure, nous ne voyons pas pourquoi il n'agirait pas de même vis-à-vis des

1. Rappelons que les organes avant d'être soumis à l'analyse doivent être soigneusement dépouillés de leur revêtement péritonéal qui est en contact avec le liquide chargé d'arsenic.

microbes ; on est d'autant plus porté à établir une analogie entre ces deux agents que l'on sait que les microbes se défendent en sécrétant autour d'eux des toxines, et que le trisulfure solide se défend en se solubilisant et produisant autour de lui un trisulfure liquide très toxique.

Ainsi, pour nous résumer :

Les leucocytes sont capables d'englober des substances toxiques n'ayant pas subi d'atténuation humorale.

Le trisulfure d'arsenic est actif en tant qu'il est soluble.

La solubilisation commencée *in vitro* se poursuit *in vivo*, dans la cavité peritonéale ; elle y est arrêtée par l'intervention des phagocytes; d'où immunité relative de l'animal vis-à-vis du trisulfure en suspension aqueuse.

La survie de l'animal se traduit par une chimiotaxie positive et une phagocytose intense ; la mort, surtout lorsqu'elle survient rapidement, par une chimiotaxie négative, prolongée ou définitive, et par une phagocytose insignifiante ou nulle.

La diminution du pouvoir fonctionnel des phagocytes rend l'animal moins résistant ; le renforcement du système phagocytaire accroît sa résistance naturelle.

L'acte phagocytaire ne se borne pas à la chimiotaxie et l'englobement : le trisulfure subit en plus une sorte de digestion intraphagocytaire qui se traduit extérieurement par sa désagrégation et sa transformation en un composé soluble.

Comme tous les composés solubles d'arsenic, le trisulfure, après le passage à travers les leucocytes, s'élimine surtout par le système rénal.

Dans le prochain mémoire, nous étudierons le rôle des leucocytes dans l'intoxication par les composés solubles d'arsenic; puis nous traiterons de l'immunisation des animaux et des propriétés préventives et antitoxiques du sérum fourni par les animaux immunisés.

La partie chimique de ce travail, ainsi que de ceux qui vont suivre, a été exécutée dans le laboratoire de toxicologie, à la Préfecture de police. Nous sommes très heureux de pouvoir exprimer ici notre vive reconnaissance au savant directeur du laboratoire, M. Ogier, pour son hospitalité et ses nombreux témoignages de sympathie.

ACTION DU B. COLI ET DU B. D'EBERTH SUR LES NITRATES

Par M. L. GRIMBERT

PREMIER MÉMOIRE

(Travail du laboratoire de chimie biologique de la Sorbonne.)

J'ai déjà montré[1], contrairement à une opinion émise[2], que le B. Coli et le B. d'Eberth ne dégagent pas d'azote quand on les ensemence dans une solution de peptone à 1 0/0, renfermant 1 0/0 de nitrate de potasse; mais, comme d'autre part, on obtient un dégagement gazeux quand on remplace la solution de peptone par du bouillon de viande peptoné, il m'a paru intéressant de rechercher la cause de cette différence.

Je commencerai par donner quelques détails indispensables sur la technique employée, et sur mes procédés d'analyse.

Afin de recueillir facilement les gaz, j'ai fait usage de matras de 125 c. c., à col étroit, sur lequel est soudé une tubulure latérale deux fois recourbée. Le col du matras peut-être fermé par un bon bouchon de caoutchouc.

Le matras est rempli aux 3/4 du liquide de culture. Le col est bouché par un tampon de coton, et l'extrémité inférieure du tube recourbé est coiffée par une sorte de dé de caoutchouc. Quant au bouchon, on l'enveloppe de plusieurs doubles de papier à filtre et on l'attache au ballon par une ficelle. Le tout est stérilisé à l'autoclave à 120°, en même temps qu'un ballon renfermant le même liquide de culture, et dont le col est muni également d'un tampon de coton.

Après refroidissement, à l'aide d'une pipette à boule flambée, on achève de remplir le matras tubulé ; on remplace le tampon de coton par le bouchon de caoutchouc débarrassé de ses enveloppes. Pour plus de sécurité, on porte le matras ainsi disposé à

1. *Société de biologie*, 2 avril 1898.

2. Cf. Hugounenq et Doyon. *Société de biologie*, 1897, p. 198. *Archives de physiologie*, 1898, p. 390 et 698, et *Annales de Chimie et de Physique*, 1898, p. 151.

l'étuve à 37° pendant 24 heures, après quoi on l'ensemence avec *quelques gouttes* d'une culture sur bouillon.

Une fois ensemencé, et après avoir ôté le dé de caoutchouc qui ferme la tubulure latérale, on dispose le matras de façon à conduire le gaz sous le mercure. Les gaz recueillis ont été transportés sur la cuve à mercure de Doyère et analysés par les procédés habituels.

Dosage des nitrates. — Les nitrates ont été dosés par la méthode de Schlœsing en opérant comparativement avec une solution de nitrate de potasse pur à 1 0/0. On a eu soin de se débarrasser de l'acide carbonique résultant de l'action de la liqueur acide sur le bicarbonate de potasse qui se forme parfois dans certaines cultures.

Dans le cas le plus fréquent d'un mélange de nitrate et de de nitrite, les deux sels ont été comptés comme nitrate : l'azotite a été ensuite dosé à part.

J'appellerai donc *azotate détruit* la différence entre la quantité d'azotate introduite dans le milieu de culture, et la somme (azotate + azotite) qui reste après l'expérience.

Dosage des nitrites. — Comme j'opérais sur des milieux très chargés de matières organiques et en général colorés, j'ai eu recours à un procédé analogue à celui de Vivier[1], mais que j'ai simplifié sans lui enlever de son exactitude.

Quand on fait agir l'acide nitreux sur l'urée, on obtient toujours, pourvu que celle-ci soit en excès, un volume d'azote double de celui qui correspond à l'acide nitreux.

$$CO\,(Az\,H^2)^2 + Az^2\,O^3 = 4\,Az + CO^2 + 2\,H^2\,O$$

Vivier opérait à chaud dans un courant continu d'acide carbonique, ce qui nécessitait l'usage d'un réfrigérant ascendant et d'un appareil à lessive de soude de Dupré.

On arrive aux mêmes résultats en opérant à froid de la manière suivante.

Dans une cloche à gaz, à robinet, assez courte pour être maniée facilement sur la cuve à mercure de Doyère, et remplie de mercure, on introduit successivement des volumes égaux des solutions suivantes : 1° milieu renfermant le nitrite à doser; 2° solution d'urée à 10 0/0; 3° acide sulfurique étendu de moitié d'eau.

1. VIVIER. C. R. 1888, t. CVI, p. 138.

La réaction est instantanée. On agite la cloche, et après quelques minutes de repos, on fait passer le gaz dégagé dans une pipette de Salet, garnie de lessive de soude, pour absorber l'acide carbonique.

L'azote restant est transvasé dans une cloche graduée en dixièmes de c. c. que l'on porte dans une éprouvette pleine d'eau. Le volume, réduit à 0° et à 760^{mm}, en tenant compte de la tension de la vapeur d'eau, est transformé en poids par le calcul. La moitié de ce poids appartient à l'azote du nitrite ; une simple opération donne ensuite le poids du nitrite correspondant.

Dans trois expériences, dans lesquelles j'ai fait varier la quantité de nitrite en solution, j'ai obtenu, comparativement avec le dosage au permanganate, les chiffres suivants :

	Par le permanganate.	Par le procédé donné.
Première expérience.....	79^{mg},80	79^{mg},70
Deuxième expérience....	46^{mg},32	46^{mg},20
Troisième expérience....	43^{mg},60	43^{mg},65

Le procédé est donc exact; j'ajouterai qu'il n'est influencé ni par la présence des nitrates ni par les matières organiques.

Evaluation de l'azote amidé. — Il était intéressant de se rendre compte de la quantité d'azote existant dans les milieux de culture sous forme de principes amidés divers. Ces corps me paraissant devoir jouer un rôle important dans le procès fermentatif des nitrates sous l'action des bacilles d'Eberth et d'Escherich, j'ai cherché à l'évaluer approximativement en déterminant le volume d'azote que dégage un volume donné de liquide de culture, quand on le traite par l'hypobromite de soude en excès, et cela avant toute intervention microbienne.

Sans doute ce n'est là qu'un procédé très imparfait, car telle substance comme la créatine, par exemple, qui donne tout son azote à froid avec l'hypobromite, n'en dégage que la moitié sous l'action de l'acide nitreux; mais tel qu'il est, il peut donner encore d'utiles renseignements.

Composition des milieux de culture. — Les solutions de peptone à 1 ou à 5 0/0 ont été faites avec la peptone Colas. Le bouillon peptonisé a été préparé par macération à froid, pendant 4 à 5 heures, de viande de bœuf, hachée, dans 2 fois son poids d'eau. Après ébullition pour coaguler l'albumine, on filtre et on ajoute 1 0/0 de peptone Colas; on alcalinise

légèrement avec une solution étendue de soude pure, on porte à l'autoclave pour précipiter les sels terreux et on filtre de nouveau.

Pour les solutions d'extrait de viande, j'ai fait usage du produit commercial vendu sous la marque Armour.

Tous ces milieux ont été additionnés, suivant le besoin, de 1 0/0 de nitrate de potasse pur exactement dosé.

Origine de la semence. — Le coli-bacille provenait des selles normales de l'homme. Il donnait les réactions classiques de l'espèce : indol, fermentation du lactose, etc., etc.

Le B. d'Eberth avait été tiré de la rate d'un typhique ; il ne donnait pas d'indol et ne faisait pas fermenter le lactose; son identité fut contrôlée par la séro-réaction agglutinante de Widal.

Ces deux microbes avaient été pris chacun parmi les six échantillons qui avaient déjà servi à mes premières recherches.

Remarque. — Tous nos ballons jaugeant exactement 125 c. c., nos résultats se rapportent à 1 gr. 250 de nitrate de potasse.

La durée du séjour à l'étuve a été de 34 jours.

A. — Action sur une solution nitratée de peptone a 1 0/0.

J'ai déjà montré[2] que ni le B. Coli ni le B. d'Eberth ne dégagent d'azote quand on les ensemence dans une solution de peptone à 1 0/0 renfermant 1 0/0 de nitrate de potasse. J'ajouterai, aujourd'hui, qu'il se produit seulement une petite quantité de nitrite de potasse qui n'a pas dépassé 50 milligrammes pour le B. Coli, soit 4 0/0, et 48 milligrammes pour le B. d'Eberth, soit 3,8 0/0.

B. — Action sur le bouillon peptonisé et nitraté.

Les mêmes bacilles qui sont sans action sur une solution de peptone nitratée donnent, au contraire, un dégagement gazeux quand on les fait vivre dans du bouillon peptonisé nitraté. Un tel changement dans leurs fonctions, résultant de la substitution d'un milieu à un autre, est un fait biologique assez important pour qu'on se donne la peine de l'étudier de près.

J'ai donc déterminé : 1° la nature des gaz recueillis ; 2° la

1. *Loc. cit.*

proportion d'azotate détruit ; 3° le rapport entre cette quantité et le volume d'azote dégagé ; 4° la proportion de nitrites restant en solution après l'action des microbes, et 5° le volume d'azote amidé fourni par les 125 c. c. de notre bouillon avant tout ensemencement.

D'autre part, afin de mieux faire voir, au point de vue de leur action sur les nitrates, la différence qui existe entre nos bacilles et les ferments dénitrifiants véritables, je me suis adressé à un agent énergique de dénitrification, au *bacille pyocyanique*, que j'ai ensemencé parallèlement dans une solution de peptone nitratée.

Au bout de 34 jours, *tout dégagement gazeux ayant cessé dans nos trois cultures*, nous trouvons :

	B. Coli.	*B. d'Eberth.*	*B. Pyocyanique.*
Réaction.	Neutre.	Neutre.	Très alcaline.
Gaz total..........	39cc,13	36cc,07	100cc,48
Azote.............	28cc,09	25cc,96	100cc,48
CO^2..............	11cc,04	10cc,10	0cc,00
Azotate détruit.....	0gr,112	0gr,118	0gr,910
Soit....	8,90 0/0	9,40 0/0	72,80 0/0
Azotite restant.....	0gr,289	0gr,261	0gr,136
Soit....	23,10 0/0	20,80 0/0	10,88 0/0

Si nous calculons à quel volume d'azote correspond la quantité de nitrate consommé, et si nous comparons ces deux données au volume d'azote amidé capable d'être fourni par les milieux de culture, nous obtenons les chiffres suivants :

	B. Coli.	*B. d'Eberth.*	*B. Pyocyanique.*
Azote dégagé...........	28cc,09	25cc,96	100cc,48
Azote du nitrate détruit..	12cc,34	13cc,00	100cc,41
Azote amidé............	47cc,12	47cc,12	13cc,80

La différence d'action entre ces deux catégories de microbes est frappante.

Le B. pyocyanique ne donne que de l'azote sans trace d'acide carbonique. L'acide carbonique, résultant de la combustion du carbone de la matière organique par l'oxygène du nitrate décomposé, se retrouve tout entier à l'état de bicarbonate de potasse, d'où l'alcalinité très prononcée du milieu et l'effervescence qu'il donne par les acides.

Le volume de l'azote dégagé correspond exactement à celui qui résulte de la destruction du nitrate, et il est plus de 7 fois

supérieur à celui que pourraient fournir les principes amidés de la culture.

Avec le B. coli et le B. d'Eberth, la réaction est neutre; l'azote est mélangé d'acide carbonique.

Le volume de l'azote recueilli est sensiblement *le double* de celui qui correspond au nitrate consommé et la moitié seulement de celui qui serait dégagé par l'hypobromite.

Il est évident que le B. d'Eberth et le coli n'attaquent pas les nitrates de la même façon que le B. pyocyanique. Dans notre expérience, la moitié seulement de l'azote qu'ils dégagent provient des nitrates; l'autre moitié ne peut provenir que des principes amidés du bouillon. Et il n'est pas téméraire de penser que ces substances ont été décomposées par les produits de la réduction du nitrate opérée par les bactéries, au nombre desquels est l'acide nitreux. Je dirai même que le dégagement d'azote n'a lieu que parce qu'il y a des matières amidées dans le milieu de culture. C'est le phénomène secondaire d'une action bien connue, la réduction des nitrates par le B. d'Eberth et le B. coli.

C. — Action sur les solutions d'extrait de viande.

S'il en est ainsi, il est probable qu'en fournisssant à la solution de peptone l'azote amidé qui lui manque, on obtiendra un dégagement d'azote.

C'est-ce que l'expérience justifie :

Je me suis adressé dans ce but à l'extrait de viande, comme renfermant les matériaux complexes contenus dans le bouillon. L'extrait de viande, tout le monde le reconnaît, est un assez mauvais milieu de culture par lui-même; on ne pourra donc pas invoquer ses qualités nutritives pour expliquer les différences que l'on va observer dans l'activité plus ou moins grande de la fermentation.

D'ailleurs, nous avons pris soin d'instituer parallèlement une culture dans une solution d'extrait de viande sans peptone, de sorte que nous pourrons comparer la fermentation des nitrates dans les trois milieux suivants : 1° solution de peptone à 1 0/0; 2° solution d'extrait de viande à 1 0/0 sans peptone; 3° solution d'extrait de viande à 1 0/0 additonnée de 1 0/0 de peptone.

Le bacille ensemencé est le B. Coli [1].

1. Les mêmes milieux ont été ensemencés également avec le B. d'Eberth, mais

	PEPTONE à 1 0/0	EXTRAIT DE VIANDE à 1 0/0 Sans peptone.	Avec 1 0/0 de peptone.
Réaction.	Traces d'acidité.	Traces d'alcalinité.	Neutre.
Gaz total	0	9cc,09	32cc,78
Azote	0	7cc,01	23cc,45
CO^2.............	0	2cc,08	9cc,33
Azotate détruit....	0	0gr,027	0gr,055
Soit....	0	2,16 0/0	4,40 0/0
Azotite restant	0gr,050	0gr,408	0gr,220
Soit....	4 0/0	32,64 0/0	17,60 0/0
Azote dégagé......	0	7cc,01	23cc,45
Azote de l'azotate détruit	0	2cc,90	6cc,05
Azote amidé.......	13cc,8	19cc,80	36cc,50

Ici encore, le volume de l'azote recueilli est bien supérieur à celui qui correspond à l'azotate détruit.

La peptone, en rendant le milieu plus nutritif, a apporté à la semence la source d'énergie nécessaire à sa fonction, en même temps que l'extrait de viande a fourni au milieu les matériaux azotés indispensables à la réaction secondaire.

Augmentons la proportion d'extrait de viande et nous devrons constater du même coup une augmentation dans le volume d'azote dégagé et dans le poids du nitrate détruit. C'est ce que montre l'examen du tableau suivant, relatif à une solution de peptone a 1 0/0 additionnée de 1 0/0 et de 2 0/0 d'extrait de viande.

	B. Coli.		*B. d'Eberth.*	
EXTRAIT DE VIANDE	1 0/0	2 0/0	1 0/0	2 0/0
Réaction.	Neutre.	Alcaline.	Traces d'acidité.	Faiblement alcaline.
Gaz total.........	32cc,78	44cc,83	16cc,48	31cc,36
Azote	23cc,45	31cc,82	14cc,34	26cc,25
CO^2..............	9cc,33	13cc,01	2cc,14	4cc,71
Azotate détruit....	0gr,055	0gr,140	0gr,059	0gr,118
Soit....	4,40 0/0	11,20 0/0	4,72 0/0	9,44 0/0
Azotite restant.....	0gr,220	0gr,358	0gr,142	0gr,313
Soit....	17,60 0/0	28,64 0/0	11,36 0/0	25,04 0/0
Azote dégagé......	23cc,45	31cc,82	14cc,34	26cc,25

un accident survenu au moment des dosages ne me permet pas de donner les chiffres se rapportant à la solution d'extrait de viande sans peptone. Dans ce milieu, le B. d'Eberth n'avait dégagé que 4 cc, 56 d'azote, tandis qu'il en donnait 14 cc, 34 dans la même solution additionnée de peptone.

Azote de l'azotate détruit	$6^{cc},05$	$15^{cc},44$	$6^{cc},45$	13^{cc}, »
Azote amidé	$36^{cc},5$	$60^{cc},12$	$36^{cc},5$	$60^{cc},12$

D. — Action sur la solution de peptone a 5 0/0.

Nous avons vu tout à l'heure que 125 c.c. de solution de peptone à 1 0/0 donnaient 13 c.c. 8 de ce que j'ai appelé azote amidé. La peptone contient donc aussi de ces substances capables de réagir sur l'acide nitreux, mais probablement en faible quantité, car, ainsi que je l'ai déjà fait remarquer, la quantité d'azote dégagé par l'hypobromite n'est pas nécessairement égale à celle que donnerait l'acide nitreux.

Si donc on augmente la proportion de peptone, on devra fournir au milieu une quantité suffisante d'azote amidé pour obtenir un dégagement gazeux, et si c'est réellement cet azote amidé qui entre en réaction, nous devrons retrouver entre l'azote recueilli et celui du nitrate attaqué la même disproportion que dans les expériences précédentes.

C'est en effet ce que j'ai obtenu dans l'ensemencement d'une solution de peptone à 5 0/0 nitratée.

	B. Coli.	*B. d'Esberth.*
Réaction.	Faiblement acide.	Faiblement acide.
Gaz total	$19^{cc},75$	$13^{cc},43$
Azote	$16^{cc},29$	$11^{cc},29$
CO^2	$3^{cc},46$	$2^{cc},14$
Azotate détruit	$0^{gr},079$	$0^{gr},027$
Soit	6,32 0/0	2,10 0/0
Azotite restant	$0^{gr},050$	$0^{gr},024$
Soit	4 0/0	1,92 0/0
Azote dégagé	$16^{cc},29$	$11^{cc},29$
Azote de l'azotate détruit	$8^{cc},70$	$2^{cc},90$
Azote amidé	71^{cc}	71^{cc}

E. — Action sur les nitrites.

Si l'action dénitrifiante des bacilles d'Escherich et d'Eberth est faible, s'ils dégagent peu d'azote, c'est, a-t-on dit, qu'il se forme des nitrites, substances toxiques qui arrêtent le procès fermentatif.

Ce n'est là qu'une hypothèse qu'il est facile de réduire à sa juste valeur par l'expérience suivante :

Une solution d'extrait de viande à 1 0/0, additionnée de 1 0/0 de peptone et de 1 0/0 de *nitrite de potasse*, est ensemencée avec du B. coli et du B. d'Eberth.

Les deux bactéries s'y développent très bien. Un dégagement gazeux s'y manifeste dès le deuxième jour. Au bout de 34 jours, le B. coli avait produit 29 c.c. 07 d'azote et le B. d'Eberth 22 c.c. 19, c'est-à-dire, un chiffre supérieur à celui qu'ils avaient donné précédemment dans le même milieu renfermant du nitrate.

Conclusions.

De l'ensemble de ces faits semble résulter cette conclusion que le B. coli et le B. d'Eberth ne peuvent attaquer les nitrates que si le milieu renferme des principes amidés.

C'est par la réaction secondaire qu'exerce sur ces corps l'acide nitreux qu'il y a dégagement d'azote. Je dis *acide nitreux* et non pas nitrites, ceux-ci ne pouvant agir par eux-mêmes en milieu neutre ou alcalin.

Sans doute le mécanisme intime de cette production d'acide nitreux nous échappe pour le moment. Résulte-t-il de la réduction directe des nitrates par les bactéries ; ou bien est-il mis en liberté par l'action sur les nitrites d'un acide formé aux dépens de certaines substances encore indéterminées du bouillon ?

Les expériences que j'ai entreprises sur cette question ne sont point encore assez avancées pour me permettre d'être affirmatif. Toutefois, on ne saurait invoquer la réaction neutre ou alcaline du milieu pour repousser *a priori* l'hypothèse d'une production d'acide nitreux, celui-ci, au contact des amides, se détruisant au fur et à mesure de sa production.

L'expérience suivante nous donnera d'utiles renseignements à cet égard :

Dans une cloche à robinet remplie de mercure, introduisons successivement une solution de nitrite de potasse à 1 0/0 par exemple, puis une solution d'urée, et enfin un grand excès de lessive de soude pure ; colorons le tout par de la phtaléine et faisons arriver dans le mélange, par très petites portions à la fois, une quantité d'acide sulfurique étendu, insuffisante pour saturer la soude. A chaque addition d'acide, un dégagement d'azote a lieu, et cependant le milieu reste fortement alcalin. En

effet, chaque goutte d'acide, au moment où elle arrive dans la solution alcaline, se trouve, au point où elle tombe, en excès pendant un temps très court, mais suffisant pour agir sur le nitrite. Il en résulte la mise en liberté d'acide nitreux qui réagit à son tour sur l'urée pour donner de l'azote et de l'acide carbonique ; ce dernier est absorbé par la soude et l'azote seul se dégage.

Quelque chose d'analogue ne peut-il se passer dans le bouillon entre les bactéries et les matériaux qui leur sont offerts ?

Ce n'est là qu'une hypothèse, je le sais. Les nouveaux faits que j'espère publier bientôt nous diront jusqu'à quel point elle est fondée. Pour le moment, je me contenterai de résumer ainsi les résultats de ma première série d'expériences :

1° Chaque fois que le B. coli ou le B. d'Eberth ont donné un dégagement gazeux dans un milieu nitraté, le volume de l'azote recueilli a toujours été supérieur, au moins du double, à celui qui correspond à l'azotate détruit. Par conséquent, *l'azote dégagé ne provient pas exclusivement des nitrates ;*

2° L'action dénitrifiante de ces bacilles est corrélative de la présence de matériaux amidés dans la culture ;

3° Elle semble résulter de l'action secondaire qu'exerce sur ces substances l'acide *nitreux* formé par les bactéries ;

4° La présence de nitrite n'entrave pas les fonctions du B. coli ni du B. d'Eberth, puisqu'ils se développent très bien dans des milieux renfermant 1 0/0 de ce sel, et y dégagent de l'azote en quantité égale, sinon supérieure, à celle qu'ils produisent dans le même milieu additionné de nitrate.

Le rôle que jouent les matières amidées dans la dénitrification sous l'action du *B. coli*, pourra peut être jeter quelque lumière dans la question encore pendante des pertes d'azote en agriculture. Nous nous proposons de revenir bientôt sur ce sujet.

REVUES ET ANALYSES

MAX SCHOTTELIUS. L'importance des bactéries de l'intestin dans la nutrition. *Archiv. f. Hygiene*, XXXIV, 1899.

Les lecteurs des *Annales* ont été tenus au courant [1] des travaux faits pour étudier l'importance des bactéries de l'intestin dans les phénomènes de nutrition, question que j'avais posée en 1882, dans mes recherches sur la digestion [2]. Nencki avait soutenu depuis, non seulement que la digestion pouvait se faire sans microbes, ce que je n'avais jamais nié, mais encore qu'elle se faisait sans eux, et les expériences de Nuttall et Thierfelder, résumées dans ce recueil, avaient en partie donné raison à Nencki en montrant qu'on pouvait élever et conserver pendant quelques jours de jeunes animaux dans des conditions telles qu'aucun microbe ne pénétrait dans leur canal intestinal, et que, pourtant, ils pouvaient se nourrir et augmenter de poids.

Ceci témoignait que ces microbes du canal intestinal n'étaient pas nécessaires, et à cela il était naturel de s'attendre, étant donnée la variété des diastases digestives qui sont physiologiquement versées dans les intestins. Mais Nuttall et Thierfelder n'avaient ni montré, ni dit que les microbes de l'intestin fussent inutiles, et même on pouvait conclure le contraire de leurs expériences, car les animaux dont on maintenait le canal intestinal stérile poussaient moins bien que les animaux normaux. Au 6e et au 10e jour de leur existence, ils n'avaient augmenté que de onze et seize pour cent de leur poids au moment de la naissance, tandis que les chiffres correspondant avaient été de 20 et de 61 pour cent avec les animaux normaux. En présence de ces résultats, M. Max Schottelius, professeur d'hygiène à l'Université de Fribourg, s'est senti encouragé à de nouvelles expériences, qu'il a faites dans des conditions nouvelles et curieuses.

Au lieu d'opérer, comme l'avaient fait MM. Nuttall et Thierfelder, sur de jeunes mammifères extraits de l'utérus au moyen de l'opération césarienne, et nourris de pain ou de lait stérilisés, il en est revenu à la méthode recommandée par Pasteur, de se servir de jeunes poulets éclos, dans une couveuse stérilisée aux dépens d'œufs stériles, et élevés dans des conditions qui assurent la stérilité de leur contenu intestinal.

Ce programme est très simple dans son énoncé; Pasteur ne se

1. Ces *Annales*, t. IX, p. 896, et t. X, p. 411.
2. *Comptes rendus*, t. XCIV, pp. 736, 808, 877, 976.

doutait pas des difficultés qui entourent sa mise en pratique. Gayon avait fait voir, déjà en 1875, que beaucoup d'œufs contiennent, à l'intérieur de la coquille, des germes contre lesquels on ne peut rien. Ceux qui se trouvent à l'extérieur de la coquille peuvent être atteints par des lavages désinfectants : mais un œuf bien lavé et bien propre ne donne pas nécessairement un poussin stérile, et, pour arriver à ce résultat, M. Schottelius a dû prendre des précautions multiples dont il faut lire les détails dans ses mémoires, mais que voici résumées.

Il commence d'abord par les œufs dans une couveuse artificielle. Pendant les 10 premiers jours, on ne prend aucune précaution; on retourne, aère les œufs comme à l'ordinaire. 1 ou 2 jours avant l'éclosion, on les lave avec une solution de sublimé à 5 0/0, chauffée à 40°, puis avec une solution physiologique de sel marin chauffée à la température de l'étuve; on les essuie avec de l'ouate stérile, et on les abandonne pendant 2 heures dans une étuve stérile. On recommence les lavages après cet intervalle, et on enveloppe enfin les œufs dans de la ouate chaude. C'est alors seulement que l'expérience commence.

Celle-ci est faite dans une grande chambre vitrée, d'une contenance de 8 mètres cubes, contenant une table pour les manipulations et une sorte de couveuse-volière, destinée à recevoir les œufs stérilisés et à abriter les jeunes poussins qui doivent en sortir. Cette volière, chauffée de l'extérieur par circulation d'un liquide contenant 5 0/0 de lysol, contient un petit lit d'amiante sur lequel on dépose les œufs, une petite cuvette dans laquelle de l'eau coulant d'un réservoir supérieur est maintenue à un niveau constant, et le reste du sol de la volière est occupé par une couche de 1 centimètre environ de petits cailloux du Rhin, lavés, stérilisés, et mélangés avec des débris de coquille. Le contenu de la volière est stérilisé dans un courant de vapeur d'eau bouillante, et on dépose sur le sol un gâteau stérile, formé de millet et d'albumine cuite, en quantité assez grande pour servir à l'alimentation des jeunes poulets pendant toute la durée de l'expérience.

Il faut, en effet, on le comprend, intervenir le moins possible pendant sa durée. Le poussin éclôt, et après quelques heures d'incertitudes et de désarroi, résultant probablement pour lui d'un changement aussi complet dans la tradition, il va à l'eau et à la nourriture. Le difficile est de le protéger contre les bactéries. Il ne reçoit dans sa volière que de l'air filtré sur de la ouate, et reste toujours dans une atmosphère antiseptique. L'air qui lui arrive est d'ailleurs emprunté à la grande chambre qui l'entoure, chambre dont on a lavé tout l'intérieur avec des solutions antiseptiques, dont on a stérilisé l'air au moyen des vapeurs de formol, et dans laquelle on ne pénètre que revêtu d'une cagoule et de pantalons de fort treillis, sortant de l'étuve de stérilisation. On n'entre qu'après avoir traversé une sorte de cage, servant de vestibule,

et dont le sol est formé d'une cuvette contenant une solution de sublimé, de sorte que les chaussures elles-mêmes n'apportent aucun germe. Enfin l'atmosphère de la chambre à expérience communiquait elle-même, par l'intermédiaire de filtres d'ouate, avec celle d'un laboratoire qu'on a laissé vide pendant toute la durée des expériences, et qui était, autant qu'il est possible, en parfait repos. Une précaution nécessaire, relevée également par MM. Nuttall et Thierfelder, est de maintenir aussi sèche que possible l'atmosphère de la chambre à expérience.

Malgré toutes ces précautions, toutes les expériences ne réussissent pas. Mais M. Schottelius en a fait plusieurs dans lesquelles non seulement les excréments du jeune poulet, mais même le poulet tout entier, peuvent être introduits dans de la gélatine nutritive sans y apporter de microbes. En collationnant ces expériences dans lesquelles la stérilité du canal digestif peut être considérée comme absolue, et en les rangeant d'après l'âge qu'avait le poussin au moment où on l'a tué pour l'étudier, on peut dresser une table de croissance des poulets élevés dans ces conditions. Les expériences faites sur 10 animaux montrent que le jeune poulet augmente à peine de poids. L'augmentation maximum est de 25 0/0 environ au bout de 12 jours, et l'absorption d'eau par le jeune poulet y est sûrement pour quelque chose. Au delà de 12 jours il y a plutôt diminution. Pendant ce temps l'augmentation des poulets élevés et nourris à la façon ordinaire est régulière, et monte au 12e jour à 140 0/0 et au 17e jour à 250 0/0 du poids primitif.

Il faut donc conclure que, pour le cas du jeune poulet au moins, les bactéries sont très utiles pour le travail digestif. Cette conclusion, grosse de conséquences, s'applique, comme on voit, à des aliments, millet et albumine, pour lesquels il existe normalement des diastases digestives dans le canal intestinal du jeune oiseau. Pourquoi ces diastases restent-elles inactives ? Quand on ensemence les excréments des poulets sur la gélatine, pour savoir s'ils sont stériles, on trouve que cette gélatine non seulement ne se trouble pas, mais ne se liquéfie même pas pendant les 4 à 8 premiers jours ; mais que, plus tard, les diastases contenues dans les excréments la liquéfient sans qu'on puisse y trouver trace de microbes aérobies ou anaérobies. Il semble donc, autant qu'on peut en juger par ces expériences, que la sécrétion des diastases digestives est au moins très lente pendant les premiers jours de la vie, et peut-être qu'à ce moment-là elle est très utilement remplacée par les sécrétions des microbes, qui sont toujours prêtes et abondantes.

Ce qui confirme cette idée, c'est que lorsqu'on examine les déjections des deux premiers jours, chez les poulets de contrôle nourris à la façon ordinaire, on n'y trouve pas de bactéries avant 36 ou 40 heures. Or, pendant cette période, il n'y a pas augmentation de poids. Il semble

que la nutrition n'ait pas encore commencé, et le jeune animal, bien qu'ayant de l'eau à sa disposition, ne répare pas les pertes. Il se comporte comme une légumineuse dans un milieu non azoté, avant le moment où ses racines se couvrent de tubercules. Dès que les bacilles apparaissent, puis les coccus, puis les espèces acclimatées que l'on rencontre dans le canal digestif des vieilles poules, la nutrition régulière commence.

On comprend dès lors que la suppression de cette digestion microbienne pendant les premiers jours de la vie du poulet puisse être pénible ou funeste au jeune animal, très débile à ce moment. La présence des microbes dans le canal intestinal est alors utile ou nécessaire. Plus tard elle devient adjuvante; elle-même peut devenir nuisible si la fermentation prend mauvaise tournure et verse en trop grande quantité dans l'intestin des diastases ou des toxines hostiles aux tissus. En résumé, toute notre vie implique l'existence d'une symbiose avec les hôtes de notre canal intestinal, et il ne s'agit plus de leur contester leur rôle digestif; il s'agit de le mesurer et de l'élargir ou de le restreindre suivant les cas, pour le rendre hygiénique et le faire contribuer à l'entretien de la santé, tandis qu'il est maintenant l'origine soit de troubles momentanés, soit de désordres chroniques.

E. DUCLAUX.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

13me ANNEE FÉVRIER 1899 No 2

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR L'IMMUNITÉ VACCINALE

Par MM.

A. BÉCLÈRE
Médecin de l'hôpital St-Antoine.

CHAMBON et MÉNARD
Directeurs de l'Institut de vaccine animale de Paris.

TROISIÈME MÉMOIRE

LE POUVOIR ANTIVIRULENT DU SÉRUM DE L'HOMME ET DES ANIMAUX IMMUNISÉS CONTRE L'INFECTION VACCINALE OU VARIOLIQUE

Dans deux mémoires sur l'immunité vaccinale, nous avons étudié comparativement l'action immunisante du sérum de génisse vaccinée, injecté dans le tissu cellulaire sous-cutané, et celle du virus vaccinal inoculé par la même voie [1].

Nous avons montré combien est rapide l'action immunisante du sérum, combien au contraire est tardive l'immunité consécutive à l'inoculation sous-cutanée du vaccin.

C'est dire que le sérum ne doit pas ses propriétés immunisantes à la présence dans sa masse de quelques-uns des micro-organismes, agents encore inconnus de la vaccine, mais à des substances chimiques en dissolution.

Nous avons donc été amenés à étudier, *in vitro*, l'action du sérum de génisse vaccinée sur le virus vaccinal.

Puis nous avons étendu cette étude au sérum de cheval vacciné, au sérum d'homme vacciné, au sérum des convalescents de variole, enfin au sérum des animaux inoculés avec le virus variolique.

Nous avons trouvé que tous ces sérums se comportent en

1. Ces *Annales*, 25 janvier 1896 et 25 décembre 1898.

apparence, *in vitro*, vis-à-vis du virus vaccinal, comme le font les solutions des divers antiseptiques, acide phénique, sublimé, iode, aldéhyde formique, qu'ils possèdent donc des propriétés méritant le nom *d'antivirulentes*.

Nous avons alors cherché à déterminer quelques-uns des caractères physiques et chimiques de la substance particulière qui donne au sérum de l'homme et des animaux immunisés contre l'infection vaccinale ou variolique ses propriétés spéciales vis-à-vis du vaccin. Ce chapitre de nos recherches a été en grande partie l'œuvre de M. André Jousset, interne des hôpitaux, dont la collaboration nous a été très précieuse.

Nous avons aussi étudié le moment de l'apparition de cette substance antivirulente dans le sérum des immunisés et l'époque de sa disparition, en cherchant à trouver les rapports de ces deux dates avec les divers modes d'inoculation, avec l'évolution de l'éruption vaccinale ou variolique, et surtout avec le début et la fin de la période d'immunité.

Telles sont les recherches qui font l'objet du présent mémoire[1].

I

LES PROPRIÉTÉS ANTIVIRULENTES DU SÉRUM DE L'HOMME ET DES ANIMAUX IMMUNISÉS CONTRE L'INFECTION VACCINALE OU VARIOLIQUE

A. *Action du sérum de génisse vaccinée sur le virus vaccinal.* — On sait depuis Sternberg[2], dont les recherches ont été confirmées par Kingoun[3], qu'une goutte de vaccin, mélangée à 4 gouttes de sérum d'un veau vacciné depuis deux semaines, a perdu, au bout d'une heure de contact, la propriété de provoquer une éruption vaccinale.

Nous avons fait sur ce point plus de soixante expériences avec divers sérums provenant d'une trentaine de génisses ayant subi une, deux, et jusqu'à neuf saignées successives, à des inter-

1. Nous tenons à remercier M. Octave Dehainaut, préparateur à l'Institut de vaccine animale, du soin et de l'intelligence avec lesquels il s'est acquitté des manipulations qui lui ont été confiées : il s'est montré, dans toutes nos recherches, un excellent collaborateur, comme M. Romain Gasset, chargé, dans le même établissement, de la vaccination des génisses.

2. Sternberg, *A Manual of Bacteriology*. New-York, 1892, p. 262.

3. Kingoun, *Sanit. Reports. U. S. Marine Hosp. service.* Washington, 18 janvier 1895.

valles d'au moins 24 heures. Comme elles sont toutes concordantes, il suffira d'en citer une pour faire connaître notre *modus faciendi* général, et montrer, en particulier, l'action du sérum de génisse vaccinée sur le virus vaccinal.

Une génisse non vaccinée est d'abord saignée aseptiquement, suivant le procédé indiqué par M. Nocard, par une ponction faite à la jugulaire. Puis elle est inoculée, suivant le mode habituel, par des incisions multiples aux deux côtés du tronc, avec du vaccin éprouvé : l'éruption vaccinale apparaît régulièrement et suit son cours normal. Quatorze jours après l'inoculation vaccinale, cette génisse est saignée pour la seconde fois. Ces deux saignées fournissent deux sérums qu'on recueille aseptiquement : nous les appellerons, par abréviation, sérum vacciné et sérum neuf. On en remplit presque complètement deux petites éprouvettes, stérilisées, d'une contenance de 5 à 6 c. c. A chacune on ajoute le contenu de 2 à 3 tubes, soit 20 à 30 centigrammes environ, de pulpe vaccinale d'une même récolte, et on agite soigneusement les deux éprouvettes, fermées avec des bouchons de caoutchouc stérilisés, de façon à mélanger le sérum et la pulpe vaccinale glycérinée ; puis on les couche horizontalement pour mettre bien en contact les particules élémentaires de cette pulpe avec le sérum. Au bout de 24 heures, on agite de nouveau les éprouvettes et on les place verticalement, pour permettre à la pulpe vaccinale de se déposer. Après un nouvel intervalle de 24 heures, on décante par aspiration, à l'aide d'une pipette capillaire, la presque totalité du sérum de chaque éprouvette, puis on recueille et on conserve, dans des tubes de verre scellés au chalumeau, le mélange de vaccin et de sérum qui s'est déposé au fond de l'éprouvette. On a ainsi deux vaccins, de même provenance, qui, dans des conditions identiques, ont été pendant 48 heures en contact, l'un avec du sérum de génisse neuve, l'autre avec du sérum de génisse vaccinée. Pour comparer et mesurer leur virulence, il suffit de les inoculer à un même animal, dans des régions homonymes de la surface cutanée.

Pour cette inoculation, dans presque toutes nos expériences, nous avons adopté les deux régions symétriquement placées de chaque côté du raphé médian périnéal et de son prolongement vers les mamelles. Un animal neuf, soigneusement rasé dans les limites convenables, est donc inoculé d'abord à *gauche* du

périnée, par 15 incisions, avec le vaccin traité par le sérum de génisse neuve, puis à *droite* du périnée, par 15 autres incisions, avec le vaccin traité par le sérum de génisse vaccinée : cet animal est, aussitôt après, inoculé aux deux côtés du tronc, par les multiples incisions habituelles, avec un troisième échantillon de vaccin qui n'a été en contact avec aucun sérum; on a soin de lui relever et de lui immobiliser la queue à l'aide d'un lien, pendant tout le temps nécessaire à l'absorption du virus déposé dans les incisions périnéales, pour l'empêcher de balayer les deux moitiés du champ vaccinal et de porter ainsi, de l'une à l'autre, les germes différents qu'elles renferment. Après six jours écoulés, quand l'éruption vaccinale est en pleine efflorescence, l'aspect normal des vésicules des flancs permet de juger de la bonne réceptivité de l'animal qui sert de terrain de culture aux deux vaccins à l'essai. On peut alors reproduire par le dessin l'aspect des vésicules du périnée; il est cependant préférable d'attendre encore un jour qu'elles aient atteint leur complet développement avant d'en prendre un croquis aussi fidèle que possible[1], comme celui que reproduit la figure 1.

Ainsi le vaccin, inoculé à un animal réceptif, après avoir été mélangé à du sérum de génisse neuve, donne naissance à de très belles vésicules vaccinales : il n'a donc rien perdu de sa virulence. Au contraire, le même vaccin, ensemencé sur le même terrain, après avoir été mélangé à du sérum de génisse vaccinée, tantôt ne provoque plus aucune réaction appréciable, tantôt est le point de départ d'une réaction inflammatoire qui aboutit à la formation d'une mince croûtelle de pus desséché, entre les lèvres des incisions, et, tout au plus, en un ou deux points seulement de la longueur d'un très petit nombre de ces incisions, au soulèvement de l'épiderme sous forme de pustulettes rudimentaires et avortées.[2]

Quelle que soit l'origine du sérum neuf et du sérum vacciné, qu'ils soient tous deux empruntés, à quatorze jours d'intervalle, au même animal, comme dans l'expérience précédente, ou qu'ils

1. Nous possédons, à l'appui des résultats notés au cours de nos recherches sur l'immunité vaccinale, plus de deux cent quarante témoignages de ce genre; il ne nous sera possible d'en publier qu'un très petit nombre.

2. La figure 4 de notre premier mémoire, qui reproduit fidèlement les divers degrés de l'arrêt de développement des éléments éruptifs vaccinaux consécutif aux injections sous-cutanées de sérum immunisant, est très exactement applicable aux résultats de ces nouvelles expériences.

proviennent de deux saignées faites, coup sur coup, à deux génisses, l'une neuve et l'autre vaccinée depuis quatorze jours, les résultats sont identiques.

Dans toutes nos expériences, le contact du sérum et du vaccin a eu lieu simplement à la température du laboratoire. Presque toujours il a duré 48 heures, mais nous nous sommes

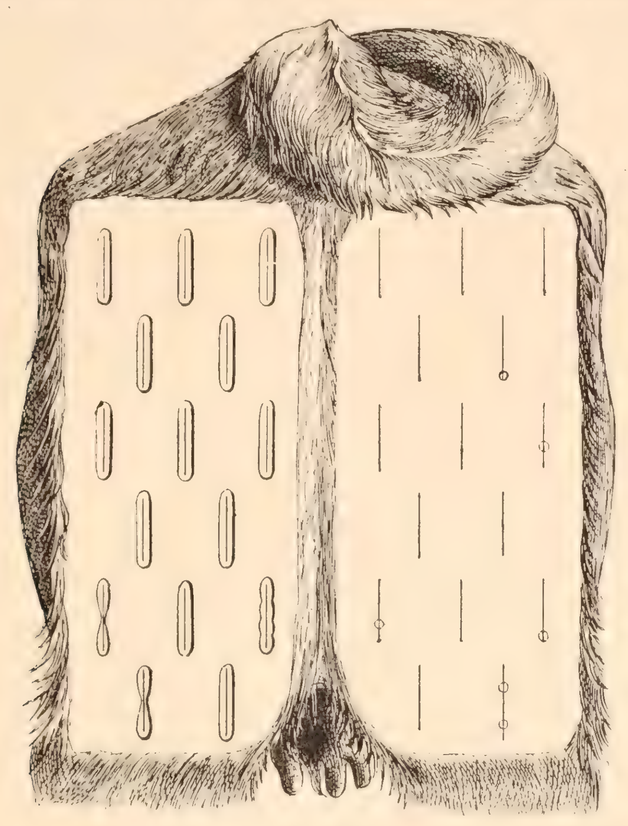


Fig. 1.

assurés, en accélérant à l'aide de la centrifugation le dépôt du vaccin au fond de l'éprouvette emplie de sérum, qu'un contact de quelques minutes seulement suffisait à produire les résultats figurés plus haut.

Si, dans nos expériences, il avait été possible de séparer parfaitement le virus vaccinal du sérum avec lequel il venait d'être en contact et de l'inoculer seul, sans aucun mélange, il

n'y aurait pas de doute sur la nature des propriétés du sérum de génisse vaccinée vis-à-vis de ce virus : on pourrait, à bon droit, les qualifier de *virulicides*, comme on appelle bactéricides celles du sérum des animaux immunisés contre plusieurs des microbes connus. Mais en réalité. dans nos expériences, le virus vaccinal n'a jamais été inoculé que mélangé à du sérum, en très petite quantité il est vrai : le mode d'action du sérum de génisse vaccinée est donc une question à réserver provisoirement.

On peut au moins, sans rien préjuger de ce mode d'action, affirmer que le sérum de génisse vaccinée possède, vis-à-vis du vaccin, des propriétés *antivirulentes*, comme on affirme les propriétés antitoxiques ou les propriétés antivenimeuses de certains sérums.

B. *Action du sérum de cheval vacciné sur le virus vaccinal.* — Pour étudier cette action, nous avons fait trente-six expériences ; huit chevaux nous ont fourni, en vingt-neuf saignées, le sérum nécessaire. Nous sommes reconnaissants à MM. Chauveau, Humbert et Nocard d'avoir facilité nos recherches, les premiers en nous permettant de retirer du sang à des animaux vaccinés par eux, dans un but expérimental, depuis une date plus ou moins éloignée, le dernier en voulant bien saigner lui-même quelques-uns de ces animaux.

Rien n'a été changé au *modus faciendi* exposé plus haut. Pour rapporter une expérience typique, un cheval de 5 ans est d'abord saigné, puis inoculé avec du vaccin de génisse, par sept piqûres seulement, tant au périnée qu'à la bouche, sur la muqueuse labiale. Ces inoculations donnent naissance à autant de très belles vésicules vaccinales. 17 jours après les inoculations, ce cheval est saigné de nouveau. A deux petites éprouvettes, emplies chacune de l'un des sérums provenant des deux saignées, on ajoute le contenu de trois tubes de vaccin de génisse, de virulence éprouvée. Après 48 heures de contact, on soutire le sérum de chaque éprouvette et on recueille le vaccin déposé au fond. Une génisse est alors inoculée de chaque côté du périnée, *à gauche* par 15 incisions avec le vaccin traité par le sérum de cheval neuf, *à droite* par 15 autres incisions, avec le vaccin traité par le sérum de cheval vacciné. Après 7 jours écoulés, voici quel est sur cette génisse, l'aspect des deux moitiés du champ vaccinal :

Mieux que toute description, la figure 2 montre que le sérum de cheval vacciné possède, vis-à-vis du vaccin, les mêmes propriétés antivirulentes que le sérum de génisse vaccinée.

C. *Action du sérum d'homme vacciné sur le virus vaccinal.* — Pour étudier l'action du sérum humain sur le virus vaccinal, nous avons fait trente expériences. Dix-neuf personnes, seize

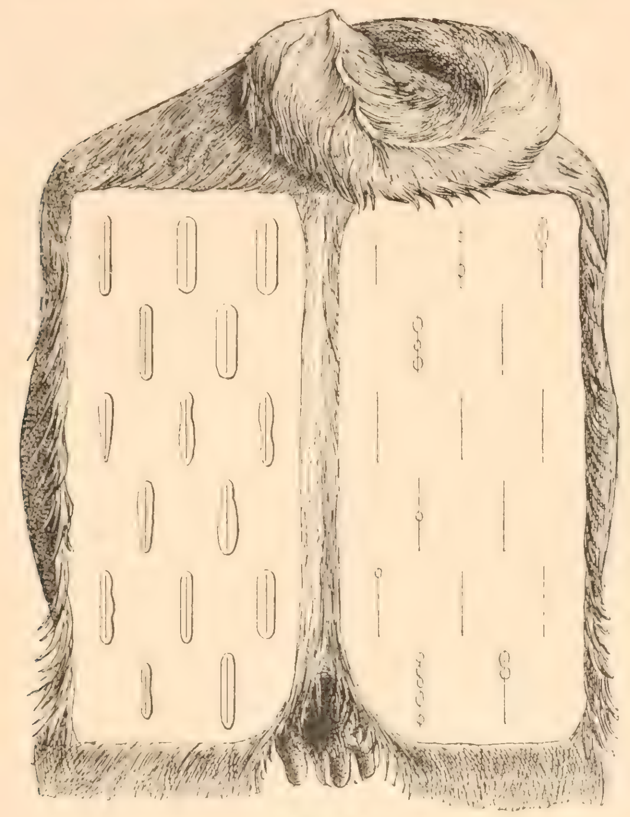


Fig. 2.

hommes et trois femmes, dans le service hospitalier de l'un de nous, ont donné le sérum nécessaire. M. André Jousset, interne du service, leur a fait, avec toutes les précautions antiseptiques et sans le plus léger accident, de petites saignées, pour la plupart de 20 à 30 grammes seulement, suivant le procédé de Straus, c'est-à-dire en introduisant une aiguille à injections hypodermiques dans l'une des veines superficielles du bras, au voi-

sinage du pli du coude, et en aspirant le sang avec une seringue. Nous ne rapporterons qu'une expérience typique.

Une femme de 44 ans, Jeanne L..., vaccinée dans l'enfance, jamais revaccinée, est saignée une première fois, puis, trois jours après, inoculée au bras gauche, par 3 piqûres, avec du vaccin frais de génisse. Cette inoculation donne naissance

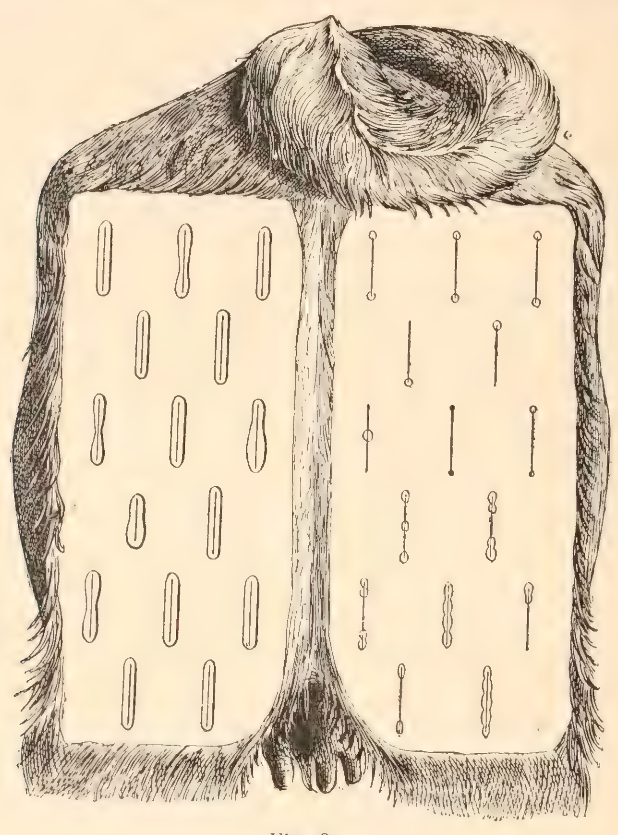


Fig. 3.

à 3 belles vésicules vaccinales dont le diamètre atteint un centimètre; c'est dire que cette femme ne possède plus aucune trace appréciable de l'immunité conférée par la première vaccination. 32 jours après cette inoculation, on lui retire de nouveau quelques centimètres cubes de sang. Le sérum provenant de la première saignée, étudié dans son action sur le virus vaccinal suivant le procédé décrit plus haut, comparativement

avec du sérum de génisse neuve, n'a pas manifesté plus de propriétés antivirulentes que ce dernier. Au contraire, voici comment se comporte le sérum fourni par la seconde saignée. Une génisse est inoculée de chaque côté du périnée, à *gauche*, par 15 incisions, avec du vaccin qui, pendant 48 heures, a baigné dans le sérum de génisse neuve; à *droite*, par 15 autres incisions, avec du vaccin qui, pendant 48 heures, a baigné dans le sérum de la femme revaccinée depuis un mois. Après six jours écoulés, l'aspect des deux moitiés du champ vaccinal est celui que représente la figure 3.

Cette figure suffit à montrer que le sérum humain, après la vaccination ou la revaccination, acquiert, vis-à-vis du virus vaccinal, des propriétés semblables à celles du sérum des animaux vaccinés.

D. *Action du sérum des convalescents de variole sur le virus vaccinal.* — Nos recherches, commencées en 1896 à l'hôpital de la Porte d'Aubervilliers (contagieux) où l'un de nous suppléait son collègue M. Roger, ont continué, grâce à la libérale obligeance de ce dernier, après qu'il eut repris la direction du service, et ont porté sur le sérum de dix varioleux, un homme et neuf femmes; ce sérum avait été recueilli, à des dates plus ou moins éloignées du début de l'éruption, avec l'aide de M. Josué et de M. Bayeux, successivement internes du service. La rareté des cas de variole à Paris depuis l'institution du service des vaccinations à domicile [1] ne nous a pas permis d'étudier le sérum d'un plus grand nombre de varioleux; mais nous avons poursuivi nos recherches en 1897, à l'hôpital Tenon, où nous avons rencontré trois hommes jamais vaccinés, et guéris de la variole respectivement depuis 26, 38 et 50 ans; M. A. Jousset a pu leur faire une petite saignée et nous donner quelques centimètres cubes de leur sérum.

Voici, pour la période de convalescence proprement dite de la variole, une observation typique. Louise C..., 19 ans, entre à l'hôpital couverte d'une éruption abondante de pustules varioliques; la maladie suit son cours régulier et aboutit, sans complication, à la guérison. Le 5 septembre 1896, 23e jour de la maladie, le 20e à partir du début de l'éruption, une petite saignée faite au pli du coude fournit environ 15 c. c. de sérum.

1. SAINT-YVES-MÉNARD, *Revue d'hygiène*, avril 1897.

Quelques jours plus tard, une génisse est inoculée, de chaque côté du périnée, à *gauche*, par 15 incisions, avec du vaccin qui pendant 48 heures, a baigné dans le sérum de génisse neuve; à *droite*, par 15 autres incisions, avec du vaccin qui, pendant 48 heures, a baigné dans le sérum de la convalescente de variole. Après six jours écoulés, l'aspect des deux moitiés du champ vaccinal est l'aspect représenté par la figure 4.

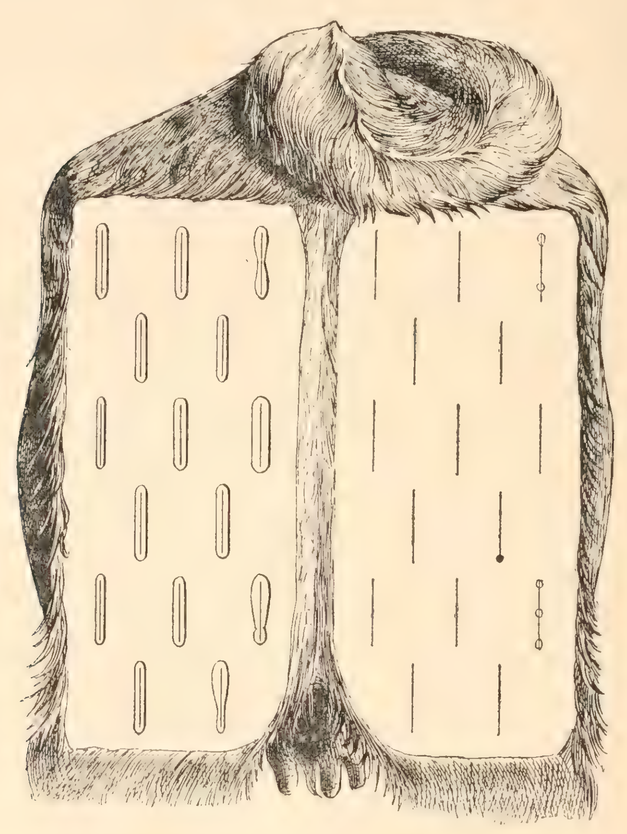


Fig. 4.

Dans un autre cas, celui d'un homme de 20 ans, vacciné dans l'enfance et cependant porteur, à son entrée à l'hôpital, d'une éruption abondante et même confluente, par places, de pustules varioliques, la saignée est faite le 29 septembre 1896, 27 jours après le début de l'éruption. Dans le sérum qui en provient, on laisse baigner pendant 48 heures du vaccin de virulence éprou-

vée. Ce vaccin, inoculé par vingt incisions à la région périnéale d'une génisse, aboutit à l'avortement éruptif représenté par la figure 5, tandis que du vaccin de même origine, non traité par le sérum, donne naissance, sur les côtés de l'animal, à une très belle éruption vaccinale.

De plus, quelques jours après ce résultat, une autre portion du vaccin qui a baigné 48 heures dans le sérum de convalescent

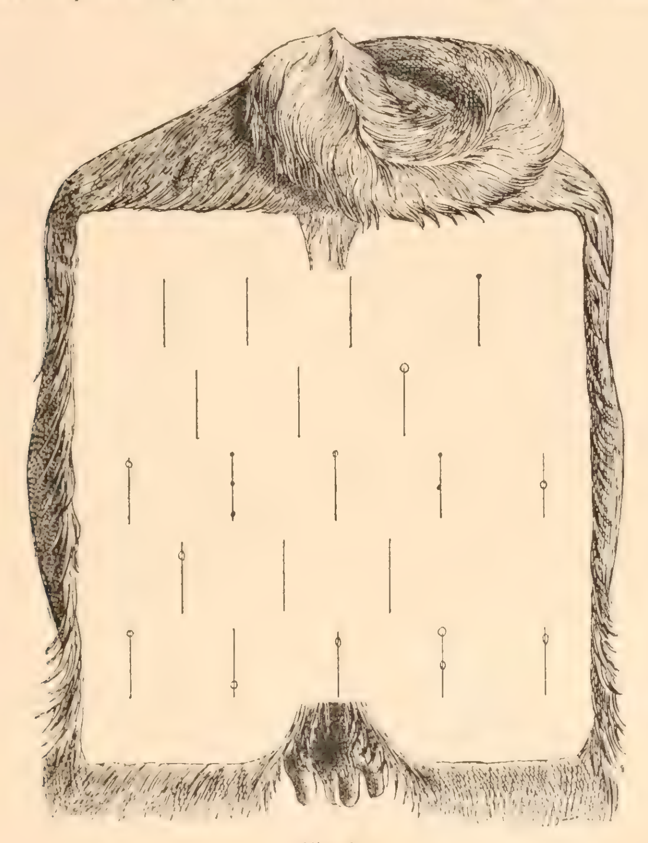


Fig. 5.

de variole est inoculé, par trois piqûres, au bras *gauche* de quatre jeunes enfants non vaccinés, tandis qu'on leur inocule immédiatement au bras droit, par trois piqûres, du vaccin normal. Aucun de ces quatre enfants ne présente, au bras gauche, la moindre réaction, tandis que tous les quatre portent au bras droit, dans les délais habituels, trois belles vésicules vaccinales.

Ces deux exemples suffisent à démontrer le pouvoir antivirulent acquis à l'égard du vaccin par le sérum des convalescents de variole.

E. *Action du sérum des animaux variolisés sur le virus vaccinal.* — L'heureuse rareté de la variole à Paris nécessitait, pour nos recherches, l'étude du sérum des animaux variolisés. Nous avons donc tenté, après beaucoup d'autres expérimentateurs, de donner la variole à des animaux appartenant aux espèces domestiques chez qui l'inoculation vaccinale est couramment suivie de succès. En 1896, dans un laboratoire bien isolé, éloigné de tout établissement vaccinal et surtout à l'abri de toute introduction accidentelle de vaccin, l'un de nous s'est efforcé de faire à des génisses, à des chevaux, à des cochons, des inoculations sous-épidermiques de virus variolique, mais sans parvenir à provoquer la réaction locale caractéristique.

En revanche, à trois singes macaques nous avons fait, avec succès, des inoculations sous-épidermiques de virus variolique, en série : elles ont donné naissance à des vésicules présentant le même aspect et la même évolution que les vésicules vaccinales. Cependant nous avons vainement tenté de réensemencer leur contenu sous l'épiderme du cheval, de la génisse et du cochon.

Le premier des macaques inoculés en série avec du virus variolique a reçu, par 66 incisions et piqûres, sous l'épiderme du dos et des bras, préalablement rasés, savonnés et aseptisés, trois virus différents : deux nous ont été obligeamment envoyés de Marseille par les docteurs Coste et Chassy; nous avons récolté le troisième à l'hôpital de la Porte d'Aubervilliers. Quatre jours après, les 41 inoculations faites avec les virus varioliques de Marseille ont toutes donné naissance à des papulo-vésicules assez semblables, sauf la couleur de la peau, à celles que présentent les enfants vaccinés depuis quatre jours. Au contraire, les 25 inoculations faites avec le virus d'Aubervilliers demeurent stériles : il est à remarquer, en passant, que ce dernier virus a été recueilli sur une femme atteinte de variole confluente secondaire, à qui l'un de nous, 48 heures auparavant, a injecté en trois fois, sous la peau de l'abdomen, dans un but thérapeutique, un litre et demi de sérum de génisse vaccinée.

Tandis que l'éruption variolique du singe paraît évoluer régulièrement au point de vue morphologique, son état général

devient mauvais : il a de la diarrhée, de la fièvre, de l'œdème, de l'albuminurie et meurt 14 jours après les inoculations du virus variolique. Quelques minutes avant la mort de ce singe, notre ami le docteur Ungauer, qui nous assiste dans ces recherches, parvient à lui ouvrir l'artère fémorale : la petite quantité de sang qu'il retire fournit, après coagulation, environ 2 c. c. de sérum.

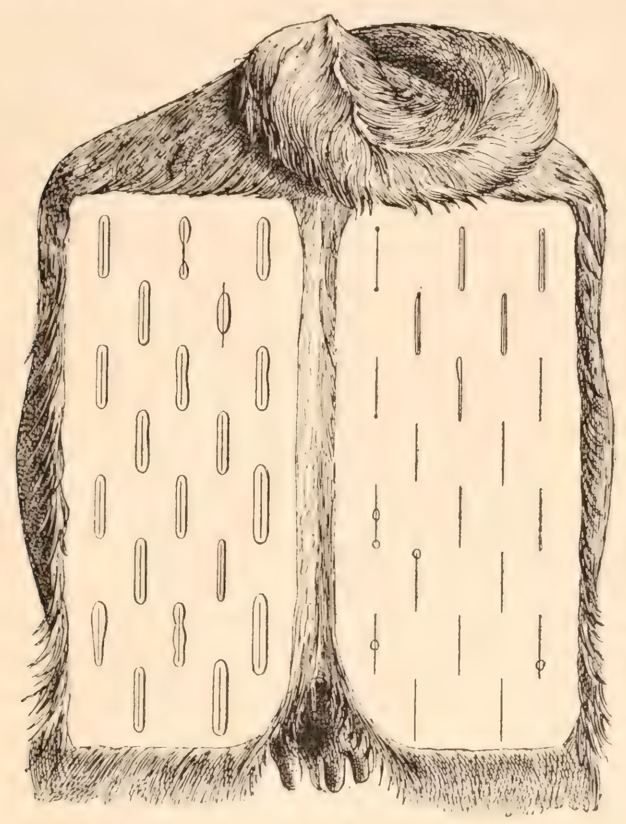


Fig. 6.

Une génisse est inoculée de chaque côté du périnée : *à gauche*, par 20 incisions, avec du vaccin qui, pendant 48 heures, a baigné dans du sérum de cheval neuf ; *à droite*, par 20 autres incisions, avec du vaccin qui, pendant 48 heures, a baigné dans le sérum du singe inoculé de variole. Après sept jours écoulés, l'aspect des deux moitiés du champ vaccinal est celui que représente la figure 6.

Cette figure montre bien que la variole inoculée au singe

confère à son sérum des propriétés antivirulentes comparables à celles du sérum humain des convalescents de variole.

Mais la peau n'est pas la seule voie d'introduction du virus dans l'organisme. Comme on le sait, chez le cheval et chez la génisse, l'injection du virus vaccinal dans le tissu cellulaire sous-cutané ou dans une veine les rend réfractaires à toute inoculation ultérieure de vaccin, c'est-à-dire leur donne l'immunité d'une façon certaine sans qu'aucune éruption se soit manifestée : c'est la *vaccine sans exanthème* de M. Chauveau.

De même, on le sait aussi, il existe une *variole sans exanthème :* le virus variolique injecté dans le tissu cellulaire sous-cutané ou dans une veine chez le cheval et chez la génisse, les rend, en effet, réfractaires à toute inoculation ultérieure de lymphe vaccinale, leur conférant, sans manifestations générales ni locales, l'immunité (Chauveau).

Un animal peut se montrer rebelle à l'inoculation sous-épidermique du virus variolique et cependant réagir à l'inoculation sous-cutanée ou intraveineuse de ce virus, puisque, après l'opération, il a acquis ce qu'il ne possédait pas auparavant, l'immunité vis-à-vis du virus vaccinal. Tel nous est apparu le cheval, au cours de nos recherches ; à 10 jeunes chevaux nous avons vainement tenté d'inoculer sous l'épiderme divers virus varioliques, les uns d'origine humaine, envoyés de Marseille, et ayant, entre nos mains, témoigné de leur activité virulente sur le singe, les autres cultivés et tout récemment récoltés sur ce dernier animal. Voici cependant les résultats que nous a donnés l'étude du sérum de cheval variolisé par inoculation intraveineuse.

M. Chauveau a bien voulu mettre à notre disposition le sang d'un cheval auquel il a injecté, dans la veine jugulaire, 2 c. c. d'une dilution dans l'eau de virus variolique. 28 jours après cette injection, ce cheval a été inoculé, sans aucune réaction appréciable, par quatre piqûres, deux aux naseaux et deux au périnée, avec du vaccin de virulence éprouvée. Onze autres jeunes chevaux ont reçu de la même façon du virus variolique en injection intraveineuse et acquis de même l'immunité vaccinale, comme l'ont démontré des inoculations ultérieures d'un vaccin qui, sur des chevaux témoins, a fait naître de très belles vésicules. M. Nocard a l'obligeance de saigner lui-même ce cheval, trois

mois après l'inoculation variolique intraveineuse, et de nous donner le sérum recueilli. Nous avons eu maintes fois l'occasion de constater que le sérum de cheval neuf n'exerce aucune action sur le virus vaccinal. Une génisse est inoculée, de chaque côté du périnée : *à gauche*, par 15 incisions, avec du vaccin qui a baigné 48 heures dans du sérum de génisse

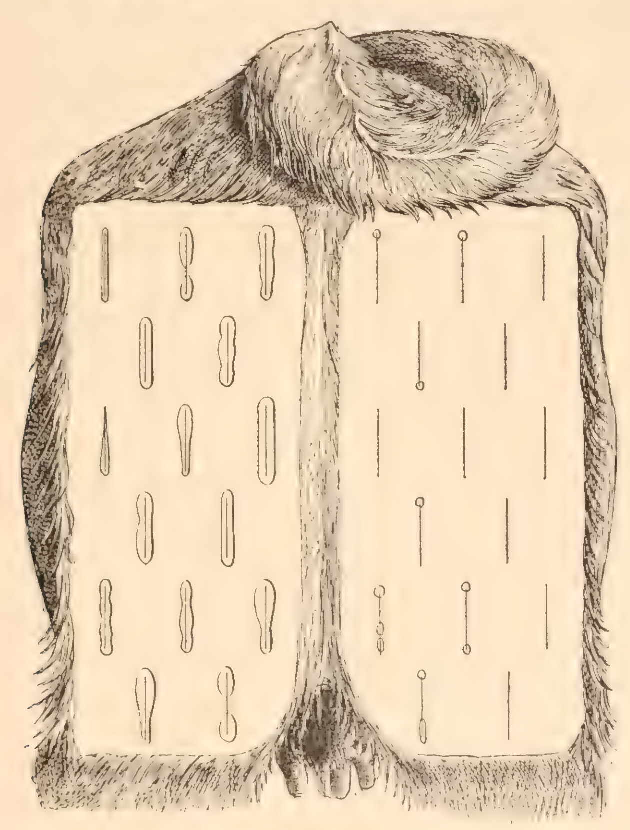


Fig. 7

neuve ; *à droite*, par 15 autres incisions, avec du vaccin qui a baigné 48 heures dans le sérum du cheval variolisé par inoculation intraveineuse. Après six jours écoulés, l'aspect de l'éruption qui occupe les deux moitiés du champ vaccinal est celui que représente la figure 7.

Cette figure montre que l'inoculation intraveineuse du virus variolique au cheval ne lui confère pas seulement l'immunité

vaccinale, comme l'a démontré M. Chauveau, mais qu'elle donne à son sérum des propriétés antivirulentes à l'égard du vaccin : c'est un caractère nouveau et positif de la *variole sans exanthème*.

En résumé, les animaux variolisés par inoculation sous-épidermique, avec réaction locale caractéristique, comme le singe, ou par inoculation intraveineuse, sans éruption cutanée consécutive, comme le cheval et vraisemblablement la génisse (nous n'avons pas répété l'expérience sur cet animal), possèdent également, vis-à-vis du vaccin, à la ressemblance des convalescents de variole, un sérum antivirulent.

Des faits qui précèdent il ne faudrait pas inférer que, chez les espèces habituellement réfractaires à l'inoculation sous-épidermique du virus vaccinal ou variolique, il suffit d'injecter l'un de ces virus dans le tissu cellulaire sous-cutané ou dans les vaisseaux sanguins, pour donner au sérum des propriétés antivirulentes. C'est ainsi que chez le lapin nous avons maintes fois tenté l'inoculation vaccinale sous-épidermique sans aucun succès. Après nous être assurés que le sérum de cet animal n'a pas plus d'action sur le vaccin que le sérum de génisse neuve, nous avons injecté à plusieurs lapins du virus vaccinal sous la peau et dans la veine marginale de l'oreille, sans parvenir à rendre leur sérum antivirulent, au moins d'une manière constante et certaine, car nous avons obtenu quelques résultats douteux.

Pour conclure, nous croyons avoir mis hors de doute les propriétés antivirulentes que possède, au moins vis-à-vis du virus vaccinal, le sérum de l'homme et des animaux immunisés contre l'infection vaccinale ou variolique.

II

LA SUBSTANCE ANTIVIRULENTE DU SÉRUM DES VACCINÉS

Connaissant les propriétés antivirulentes du sérum de l'homme et des animaux immunisés contre l'infection vaccinale ou variolique, nous avons cherché, avec la collaboration de M. A. Jousset, à déterminer quelques-uns des caractères physiques et chimiques de la substance à laquelle ce sérum doit ses propriétés spécifiques. Trente expériences ont été consacrées à cette recherche : elles ont porté presque exclusivement sur les sérums qu'il nous

était le plus facile d'obtenir en assez grande quantité, c'est-à-dire sur les sérums de génisse vaccinée et de cheval vacciné. Le procédé d'étude est demeuré le même : il a toujours consisté dans l'inoculation à la génisse, en deux régions homonymes, de deux échantillons du même vaccin traités, dans les mêmes conditions, par le contact avec deux sérums, différents seulement d'origine, et provenant l'un d'un animal neuf, l'autre d'un animal vacciné.

Nous avons d'abord constaté que du sérum de génisse vaccinée se montre, après un an de conservation, aussi actif à l'égard du vaccin qu'aussitôt après la saignée. Nous avons vu du sérum longtemps exposé à la lumière solaire, du sérum couvert d'une couche épaisse de moisissures, du sérum impur et exhalant déjà une très mauvaise odeur, témoigner, par leur action sur le vaccin, qu'ils n'avaient rien perdu de leur pouvoir antivirulent.

Nous avons étudié surtout l'influence de la chaleur sur la substance antivirulente. Deux échantillons de sérum de génisse vaccinée, l'un non chauffé et l'autre ayant séjourné une heure dans l'étuve réglée à 70°, se sont montrés également antivirulents. L'expérience, répétée dans les mêmes conditions, d'une part sur du sérum de cheval vacciné par inoculation intraveineuse, d'autre part sur du sérum de cheval variolisé par inoculation intraveineuse, a donné les mêmes résultats : le chauffage n'a pas altéré les propriétés antivirulentes de ces deux sérums, et cependant il a été porté à une température telle que, parmi les éprouvettes pleines de sérum, mises à l'étuve, il en est dont le contenu s'est partiellement ou même totalement solidifié. Nous ferons voir plus loin que la substance antivirulente desséchée résiste à une température de 100° et même à une température plus élevée.

La filtration du sérum des vaccinés n'empêche pas le passage de la substance antivirulente. Nous avons filtré dans le vide, sous la pression atmosphérique, successivement à l'aide de bougies Chamberland et à l'aide d'une petite bougie d'alumine provenant de la maison Fontaine, divers sérums de génisse vaccinée, sans trouver de différence appréciable entre le pouvoir antivirulent de la portion filtrée du sérum et celui de la portion demeurée sur le filtre. Il est vrai que nous nous sommes servis exclusivement, dans ces expériences, de sérums fortement antivirulents.

Par contre, les membranes habituellement employées pour

la dialyse paraissent s'opposer au passage de la substance anti-virulente.

10 c.c. de sérum antivirulent de génisse vaccinée emplissent un petit dialyseur qui baigne dans 100 c.c. d'eau distillée stérilisée. Après douze jours de dialyse, on constate que cette eau tient en dissolution des chlorures, mais aucune trace d'albumine. On fait baigner du vaccin 48 heures dont cette eau : inoculé au périnée d'une génisse, il donne naissance à de très belles vésicules vaccinales, tandis que, sur le même animal, les inoculations faites avec le vaccin traité par le sérum qui emplit le dialyseur demeurent stériles. D'autre part on s'assure que le sérum de génisse vaccinée, en dilution à 1/10, à 1/100, et même à 1/1000, manifeste encore son pouvoir antivirulent.

Si la substance antivirulente du sérum ne dialyse pas, c'est parmi les matières albuminoïdes du sérum qu'il convient de la chercher, et il importe de savoir si elle est, de préférence, attachée aux globulines ou aux sérines, en supposant qu'elle ne constitue pas une substance protéique distincte.

Nous avons d'abord vérifié, dans une première expérience, que la substance antivirulente est bien contenue dans les matières albuminoïdes du sérum, en constatant qu'elle est précipitée avec ces matières par l'alcool.

Une autre expérience nous a fait voir qu'elles la contiennent tout entière.

A 20 c. c. de sérum de génisse vaccinée, on ajoute 80 c. c. d'alcool à 90° : il se forme un précipité abondant qu'on recueille immédiatement. par filtration sur papier Berzélius, et qu'on en détache avant complète dessiccation, pour le dessécher à l'air libre, sur le plateau de l'étuve à cultures. En 12 heures, il est devenu sec, raccorni et léger, de couleur jaune foncé ; il pèse 1 gr. 27 : c'est une proportion de 63 gr. 50 de matières précipitées par l'alcool et desséchées, pour un litre de sérum. Il est fragmenté, broyé au mortier et réduit en une poudre d'un blanc jaunâtre qu'on redissout, mais incomplètement, dans 20 c. c. de solution saline physiologique : dans cette solution, on fait baigner du vaccin. D'autre part le liquide filtré, de volume cinq fois plus grand que le liquide employé, est évaporé à l'air libre, et ne laisse, après 24 heures, qu'un faible résidu visqueux, légèrement coloré, qui se redissout parfaitement dans 20 c. c. de solution saline physiologique : dans cette solution on fait aussi baigner du vaccin. Enfin, dans une troisième éprouvette, pleine de sérum de génisse neuve, baigne du vaccin de même provenance et en même quantité que les deux autres. Après 48 heures de contact dans les trois éprouvettes, on

retire les trois vaccins. Une génisse est inoculée de chaque côté du périnée, *à gauche*, par dix incisions, avec le vaccin traité par la solution aqueuse des matières qu'a précipitées l'alcool; *à droite*, par dix autres incisions, avec le vaccin traité par la solution de ce qui reste dans le sérum, après cette précipitation; enfin, *en bas*, à gauche et à droite, par dix dernières incisions, avec le vaccin traité par le sérum de génisse neuve. Après sept jours écoulés, l'aspect présenté par les trois champs vaccinaux est celui que représente la figure 8 :

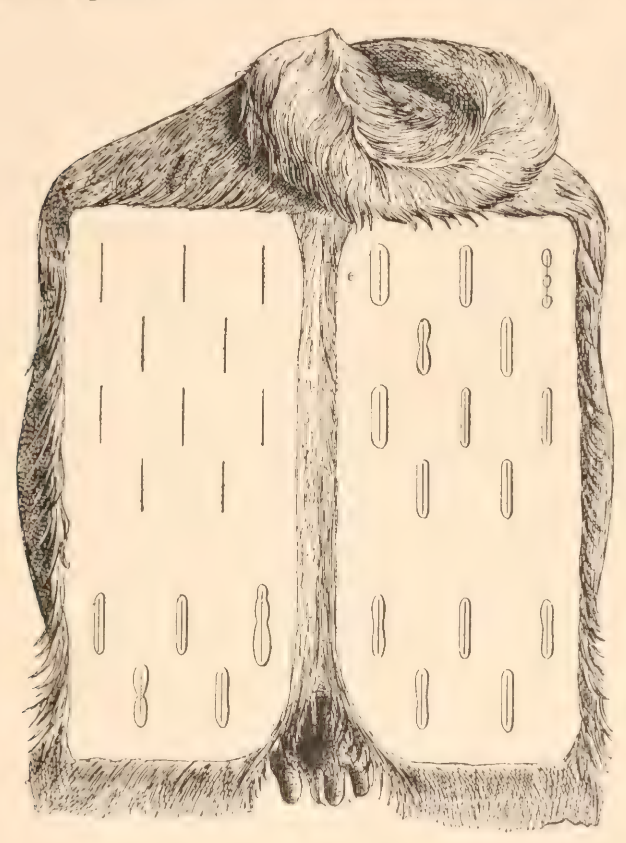


Fig. 8.

D'après l'examen de cette figure, il semble bien que la substance antivirulente est tout entière contenue dans le précipité produit par l'alcool.

Ce précipité alcoolique, très facilement soluble au début dans l'eau ou dans la solution saline physiologique, devient souvent plus tard à peu près insoluble et ne cède plus ni à l'eau

ni à la glycérine, même après six jours de contact, la substance antivirulente qu'il renferme.

Nous avons alors traité, d'après la méthode de Hammarsten, du sérum neuf et du sérum vacciné, et, après avoir séparé les globulines des sérines, nous avons recherché et comparé leur action sur le vaccin.

Deux génisses, l'une vaccinée depuis 14 jours, l'autre non vaccinée, sont saignées dans la même journée. A chacun des deux sérums provenant de ces saignées on ajoute une solution saturée de sulfate de magnésie jusqu'à précipitation complète (on s'assure que la précipitation est complète en ajoutant un peu de la même solution à une petite portion filtrée). On filtre sur papier Berzélius. Il se dépose sur le filtre un précipité floconneux, légèrement jaunâtre, qu'on lave avec la solution magnésienne jusqu'à ce qu'il devienne d'un beau blanc et jusqu'à ce que les dernières gouttes qui s'écoulent de l'entonnoir ne se troublent plus ou du moins presque plus par la chaleur (après dix lavages, le filtrat chauffé donne encore un léger louche à peine appréciable). De tous ces lavages, il résulte que le filtrat est très étendu : la sérine qu'il renferme est diluée dans quatre fois et demie le volume primitif du sérum ; cette solution de sérine contient en outre, avec les sels solubles du sérum, environ 50 grammes pour 100 de sulfate de magnésie. Quant au dépôt de globuline demeuré sur le filtre, il est redissous, par une série de dissolutions, dans une quantité d'eau froide équivalente au volume primitif du sérum; cette solution de globuline contient en outre 6 grammes pour 100 de sulfate de magnésie.

Dans deux éprouvettes, emplies des deux solutions de globuline, on fait baigner du vaccin pendant 48 heures.

Une génisse est inoculée de chaque côté du périnée, *à gauche*, par quinze incisions, avec le vaccin traité par la solution de globuline extraite du sérum neuf; *à droite*, par quinze autres incisions, avec le vaccin traité par la solution de globuline extraite du sérum vacciné. Après sept jours écoulés, l'aspect des deux moitiés du champ vaccinal est celui que reproduit la figure 9.

Cette figure montre, de façon certaine, que le pouvoir antivirulent du sérum des vaccinés est attaché à la globuline, que la substance spécifique de ce sérum se comporte comme une globuline, sans qu'on puisse dire toutefois qu'elle est une globuline. D'ailleurs, la sérine ne semble pas retenir une part appréciable du pouvoir antivirulent, car en opérant de la même façon, mais en remplaçant les solutions de globuline par les solutions de sérine passées au travers du filtre, on ne trouve aucune différence appréciable entre les deux moitiés du champ vaccinal : la sérine de génisse vaccinée ne semble donc pas plus antivirulente que la sérine de génisse neuve.

Ainsi la globuline paraît retenir seule, à l'exclusion de la sérine, le pouvoir antivirulent du sérum des vaccinés.

Nous avons profité de cette notion et de la possibilité d'obtenir, sous forme de poudre sèche, la substance antivirulente du sérum des vaccinés, attachée à la globuline, pour étudier sa résistance à l'action de températures plus élevées que celle où se produit la coagulation du sérum.

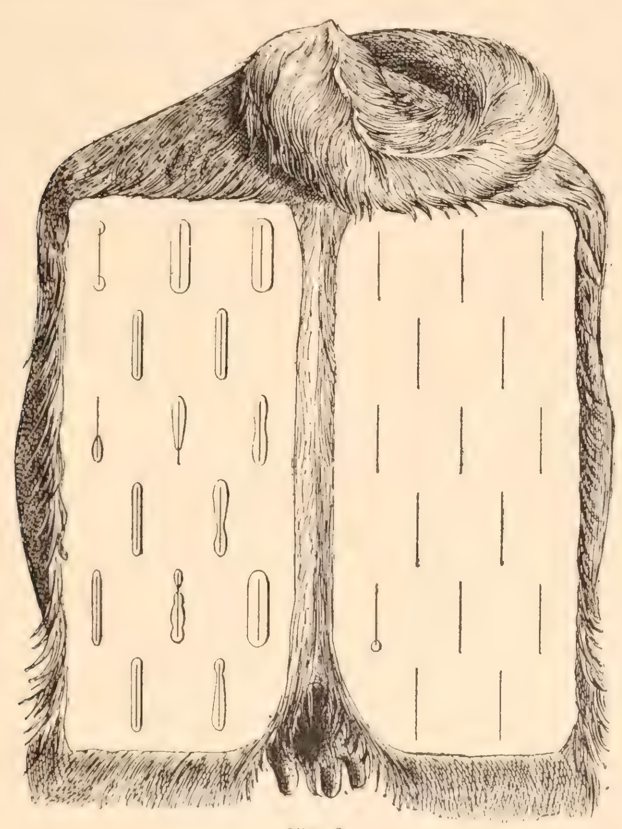


Fig. 9.

Un échantillon desséché et pulvérulent de globuline extraite du sérum d'une génisse vaccinée est maintenu à une température de 100° pendant une demi-heure, au bain-marie, puis il est dissous dans un volume d'eau égal à celui du sérum dont il provient; un autre échantillon de la même globuline est semblablement dissous, sans avoir été chauffé. Dans ces deux solu-

tions, on fait baigner du vaccin pendant 48 heures. Une génisse, inoculée de chaque côté du périnée avec l'un et l'autre de ces deux vaccins, ne présente, après sept jours écoulés, aucune éruption vaccinale : les inoculations demeurent stériles aussi bien à droite qu'à gauche, tandis que les côtés du tronc, inoculés avec du vaccin normal, portent une éruption régulière. Le chauffage à 100° pendant 30 minutes n'a rien fait perdre à la globuline de ses propriétés antivirulentes.

Une autre expérience, faite avec la même globuline, laissée, pendant un quart d'heure, à 125° dans l'étuve sèche, a montré que ce chauffage n'a pas complètement détruit le pouvoir antivirulent de la globuline, mais l'a certainement beaucoup amoindri. On voit la ténacité et la résistance à la chaleur, comme aux autres causes de destruction, que possède la substance antivirulente du sérum des vaccinés, surtout quand elle est desséchée.

En résumé, cette substance, de composition très stable, ne dialyse pas, est précipitée par l'alcool avec les matières albuminoïdes du sérum, et semble attachée exclusivement ou presque exclusivement à la globuline, sans que nous connaissions d'ailleurs sa véritable nature.

Ces caractères sont exactement ceux que MM. Tizzoni et Schwarz[1] ont depuis longtemps reconnus à la substance spécifique, contenue dans le sérum des animaux immunisés contre la rage, dont ils ont démontré les propriétés antivirulentes à l'égard du virus rabique.

Les caractères de la substance antivirulente du sérum des vaccinés ne se rapprochent pas moins, l'action spécifique mise à part, des caractères de la substance antitoxique du sérum des animaux immunisés contre le tétanos ou contre la diphtérie.

Ils se rapprochent aussi singulièrement des caractères de la substance agglutinante du sérum des typhiques, tels que les ont observés MM. Widal et Sicard, M. Hayem, MM. Achard et Bensaude.

1. Tizzoni et Schwarz, *Annales de micrographie*, 1891-1892, p. 169.

III

DATE D'APPARITION DE LA SUBSTANCE ANTIVIRULENTE DANS LE SÉRUM DES VACCINÉS

L'apparition de la substance antivirulente dans le sérum des vaccinés est toujours séparée de l'inoculation virulente par une période d'incubation de plusieurs jours. Nous avons cherché à fixer la date de cette apparition en l'étudiant dans ses rapports :

1° Avec les diverses voies d'introduction du virus dans l'organisme ;

2° En cas d'inoculation sous-épidermique, avec le processus anatomique de formation, de suppuration et de dessication des éléments éruptifs ;

3° En ce même cas, avec la disparition de la virulence du contenu des éléments éruptifs ;

4° Avec le début de la période d'immunité.

Il n'a pas dépendu de nous de pouvoir réaliser les diverses parties de ce programme successivement sur chacune des espèces sensibles à l'infection vaccinale ou variolique. Cependant l'expérience nous a montré qu'on ne doit pas faire à ces espèces en général l'application de ce qui est observé chez l'une d'elles : pour ce qui regarde l'apparition et la disparition de la substance antivirulente dans leurs rapports avec l'immunité, ces diverses espèces présentent entre elles de notables différences; nous tenterons de signaler au moins les principales.

1° *Inoculation virulente.* — Quelle que soit la voie d'introduction du virus vaccinal ou variolique dans l'organisme, qu'il s'agisse d'inoculations sous-épidermique, sous-cutanée, intraveineuse, ou que le virus-contage, comme il est vraisemblable chez les varioleux, soit absorbé par la muqueuse respiratoire, le sérum devient antivirulent, nos expériences l'ont montré, et il ne le devient jamais qu'après plusieurs jours d'incubation.

Chez les génisses inoculées sous l'épiderme, suivant le mode habituel des incisions multiples aux deux côtés du tronc, aucune des saignées pratiquées jusqu'à la fin du 8e jour après la vaccination ne nous a fourni de sérum doué d'une action franchement antivirulente, bien que parfois, après six, sept ou huit jours, nous ayons déjà vu apparaître des indices faibles et incertains de cette action. Par contre, à partir de 13 jours écoulés, le

sérum de toutes les saignées s'est montré très antivirulent : c'est *du 9e au 13e jour* après les inoculations que nous l'avons vu commencer à manifester ses propriétés antivirulentes de façon certaine : d'ordinaire il est antivirulent après 12 jours.

Le nombre des inoculations sous-épidermiques ne nous a pas semblé avoir d'influence sur la date d'apparition de la substance antivirulente dans le sérum.

Chez des génisses vaccinées par introduction d'une faible quantité de virus dans le tissu cellulaire sous-cutané, nous avons constaté l'apparition de la substance antivirulente dans les mêmes délais qu'après les inoculations sous-épidermiques.

Nous n'avons pas fait à la génisse d'inoculation intraveineuse.

Chez le cheval, des expériences, encore trop peu nombreuses, nous portent à conclure que, par comparaison avec la génisse, la date d'apparition de la substance antivirulente peut être retardée d'au moins un ou deux jours, aussi bien après les inoculations sous-épidermiques qu'après l'inoculation sous-cutanée. Le cas le plus typique fut celui d'un cheval vacciné suivant ce dernier mode et quotidiennement saigné à partir du neuvième jour : c'est seulement le sérum recueilli après 14 jours qui se montra antivirulent, tandis que le sérum recueilli la veille ne différait pas, dans son action sur le virus vaccinal, du sérum recueilli avant l'inoculation; encore le sang ne devint-il très antivirulent que 24 heures plus tard, c'est-à-dire seulement après 15 jours écoulés.

Chez le cochon, l'apparition de la substance antivirulente semble plus précoce d'un ou deux jours que chez la génisse.

L'impossibilité de faire à nos malades des saignées répétées nous a empêchés de déterminer directement, chez l'homme, la date d'apparition de la substance antivirulente. Comme nous le montrerons plus loin, il y a des raisons de supposer que, chez l'homme, cette date est d'ordinaire un peu plus tardive que chez la génisse. Cependant nous avons observé un homme de 34 ans, dont le sérum était dépourvu d'action antivirulente sur le vaccin, à son entrée à l'hôpital, et qui nous donna un sérum manifestement antivirulent 12 jours après la *revaccination*, faite par trois piqûres au bras. Cet homme, vacciné dans l'enfance, avait été, un an auparavant, réinoculé sans succès; les vésicules qui

succédèrent à notre revaccination témoignèrent par leur développement incomplet de la persistance d'un certain degré d'immunité qui ne fut peut-être pas sans relation avec la date d'apparition de la substance antivirulente. D'autre part, chez un homme de 51 ans, vacciné seulement dans l'enfance, ne présentant pas de cicatrices vaccinales et revacciné avec succès à l'hôpital, nous avons constaté que le sérum, recueilli 6 jours plus tard, n'était nullement antivirulent, tandis qu'une seconde saignée, pratiquée 14 jours après la vaccination, nous fournit un sérum faiblement, mais certainement doué de propriétés antivirulentes.

Chez les varioleux, il ne nous a pas non plus été possible de déterminer exactement la date d'apparition de la substance antivirulente. Chez trois convalescents : un homme de 20 ans, saigné au 27ᵉ jour de l'éruption variolique; une femme de 43 ans, saignée au 21ᵉ jour ; et une femme de 19 ans, saignée au 20ᵉ jour, le sérum s'est montré très fortement antivirulent. Par contre, chez deux femmes, de 24 et de 42 ans, saignées en pleine éruption variolique au 4ᵉ jour, et chez une autre femme de 38 ans, saignée au 6ᵉ jour de l'éruption variolique, le sérum s'est révélé nettement, mais très faiblement antivirulent. Chez une dernière malade de 31 ans, saignée au 11ᵉ jour de l'éruption variolique, le sérum ne montrait encore qu'une action antivirulente manifeste, mais insuffisante pour amener l'insuccès complet d'aucune des inoculations vaccinales. Comme la naissance de l'exanthème variolique est séparée du moment de la contagion par une période silencieuse d'incubation de 8 à 10 jours, suivie d'une période d'invasion de 2 à 3 jours, on voit quel intervalle de temps s'écoulerait entre le début de l'infection et l'apparition ou tout au moins la complète formation de la substance antivirulente. Cette question que nous croyons très importante appelle de nouvelles recherches.

Quant aux animaux variolisés, en ce qui concerne la date d'apparition de la substance antivirulente, nous avons pu constater seulement que, chez un singe, inoculé avec succès sous l'épiderme par des piqûres multiples avec du virus variolique, le sérum recueilli huit jours plus tard ne se montrait pas antivirulent, tandis qu'il l'était devenu manifestement chez un autre singe, saigné quatorze jours après les inoculations varioliques sous l'épiderme.

2° *Processus éruptif.* — L'exanthème n'est pas, on le sait, un élément indispensable de l'infection vaccinale ou variolique, et nous avons montré qu'il ne constitue pas non plus une condition nécessaire de l'apparition de la substance antivirulente dans le sérum des animaux vaccinés ou variolisés par inoculation sous-cutanée ou intraveineuse. Les nodosités du tissu cellulaire sous-cutané, signalées par M. Chauveau comme la conséquence de l'inoculation par cette voie et comme l'équivalent de l'éruption, font même complètement défaut, nous l'avons fait voir dans notre premier travail, à la condition de n'employer pour ces inoculations qu'un vaccin exempt de parasites étrangers, un virus bactériologiquement pur.

Dans les cas d'exanthème vaccinal ou variolique, existe-t-il un rapport constant entre l'évolution de cet exanthème et la date d'apparition des propriétés antivirulentes du sérum ? Pour résoudre cette question, c'est surtout chez les varioleux qu'il conviendrait de l'étudier. On connaît en effet les différences que présente l'éruption variolique dans la succession de ses divers stades et dans sa durée, suivant l'existence ou l'absence d'une vaccination antérieure, suivant la date plus ou moins éloignée de cette vaccination, suivant la virulence variable du contage et d'autres conditions encore que nous ignorons : tantôt les éléments éruptifs se flétrissent presque aussitôt après la formation des papulo-vésicules, tantôt ils ne deviennent croûteux qu'après une assez longue période de suppuration, tous les états intermédiaires pouvant être observés. On verrait, chez les varioleux, si la plus ou moins longue durée du processus éruptif s'accompagne d'un retard ou d'une avance dans l'apparition du pouvoir antivirulent du sérum. La rareté des cas de variole à Paris ne nous a pas permis de faire cette étude.

Nous pouvons seulement affirmer que, chez les génisses inoculées sous l'épiderme, l'arrêt et la régression du processus éruptif précèdent de plusieurs jours sinon la production de la substance antivirulente, au moins son apparition dans le sérum, décelée à l'aide du procédé de recherche que nous avons constamment employé. Chez la génisse, il est exceptionnel que les éléments éruptifs progressent au delà de sept jours après les inoculations ; ils ont atteint à ce moment le maximum de leur développement. C'est dans le courant du huitième et plus sou-

vent du septième jour que les vésicules commencent à s'affaisser et à se dessécher : aussi la récolte du vaccin, à l'établissement de la rue Ballu, n'a jamais lieu au delà de six jours écoulés depuis les inoculations, et souvent même a lieu après cinq jours. Cependant on a vu plus haut que les propriétés antivirulentes du sérum ne deviennent manifestes que du 9e au 13e jour qui suit les inoculations, d'ordinaire après 12 jours.

3° *Disparition de la virulence de l'éruption.* — Dans le processus éruptif, considéré au point de vue de la marche de l'infection, la virulence du contenu des vésicules vaccinales ou varioliques est un élément de plus grande importance que leur morphologie. Quelle relation existe-t-il entre la disparition de cette virulence et l'apparition des propriétés antivirulentes du sérum ? Dans l'étude de cette question, une cause d'erreur est à éviter.

On sait que les croûtes vaccinales ou varioliques contiennent et peuvent conserver fort longtemps, à l'état sec, le virus inoculable ; mais les substances dont se composent ces croûtes, avant même qu'elles soient détachées de la peau, ne font plus, à vrai dire, partie intégrante de l'organisme ; on comprend qu'elles puissent demeurer inoculables après que la lymphe qui imbibe le derme sous-jacent a cessé d'être virulente : c'est donc sur cette lymphe seule qu'il convient de faire porter la recherche. Aussi, dans les expériences que nous avons faites sur des génisses vaccinées, pour déterminer le moment où disparaît la virulence du vaccin intradermique, nous avons toujours eu soin de détacher les croûtes complètement, au besoin à l'aide du rasoir, et d'essuyer soigneusement avec un linge stérilisé la partie dénudée du derme, avant de faire un pli à la peau, d'appliquer une pince à la base de ce pli et de récolter, avec ou sans grattage, la lymphe qui venait sourdre à son sommet, sur la surface dépouillée d'épiderme. Nous avons ainsi recueilli sur un même animal, à des intervalles de 24 heures, de sept à quatorze jours après les inoculations, toute une série d'échantillons du vaccin intradermique, et nous avons mesuré la virulence de chacun de ces échantillons en la comparant à celle du vaccin récolté dans les délais normaux, c'est-à-dire six jours après la vaccination : nous les inoculions tous deux à la même génisse, par 15 incisions de chaque côté du périnée, et nous prenions un croquis de l'éruption vaccinale consécutive.

A priori, on aurait pu supposer que la disparition de la virulence du vaccin intradermique marchait de pair avec la régression et la dessication des éléments éruptifs. En réalité, cette dessication précède de plusieurs jours la disparition de l'activité virulente du vaccin contenu dans le derme sous-jacent : celui-ci peut renfermer, sous des croûtes, du vaccin très actif.

Tandis que les vésicules vaccinales se dessèchent d'ordinaire au 7e jour qui suit les inoculations, nous avons vu que le vaccin intradermique, après huit jours écoulés, est habituellement très actif; dans un cas, après neuf jours, il avait perdu presque toute activité virulente, mais plusieurs fois, après dix jours, il se montrait encore assez actif et, même après onze jours, conservait des signes manifestes de virulence; dans un cas tout à fait exceptionel, après quatorze jours, il manifestait encore quelques traces d'une activité virulente très affaiblie. En résumé, c'est du 9e au 13e jour après les inoculations que disparaît d'ordinaire la virulence du vaccin intradermique; le plus souvent, après 12 jours elle n'existe plus.

On voit que, d'une façon générale, il existe une concordance parfaite entre la disparition de la virulence du vaccin intradermique et la complète manifestation des propriétés antivirulentes du sérum.

D'une manière plus précise, nous avons vérifié l'exactitude de cette concordance sur plusieurs animaux dont le sang et le vaccin ont été simultanément recueillis, pendant plusieurs jours, à 24 ou 48 heures d'intervalle.

Dans un cas, une génisse, de race hollandaise (toutes les autres venaient du Limousin), vaccinée suivant le mode habituel, présente, après quatre jours écoulés, une éruption déjà si belle que, par exception, on recueille le contenu de la plupart des vésicules huit heures avant la fin du cinquième jour. Six jours après les inoculations, les vésicules vaccinales sont déjà affaissées et desséchées. Cette génisse est saignée successivement 7 jours, 9 jours, 11 jours et 13 jours après les inoculations; on recueille du vaccin intradermique successivement après 6, 7, 8, 9, 10 et 11 jours écoulés.

Le sérum de 7 jours et le sérum de 9 jours, comparés à du sérum neuf, ne manifestent, pas plus que celui-ci, aucune propriété antivirulente, tandis que le sérum de 11 jours, comme celui de 13 jours, se montre fortement antivirulent. Parallèlement à ces résultats, les vaccins de 6 jours, de 7 jours et de 8 jours, inoculés comparativement avec le vaccin de 5 jours, ne révèlent aucune diminution de leur activité virulente; le vaccin de 9 jours et celui de 10 jours, dans les mêmes conditions, témoignent, par

le moindre développement des éléments éruptifs, d'une diminution sensible de leur virulence; seul, le vaccin de 11 jours, sans avoir perdu toute virulence, se montre très peu actif.

Dans un autre cas, sur une génisse vaccinée suivant le mode habituel, on recueille simultanément du sang et du vaccin intra-dermique 9, 10, 11, 12 et 13 jours après les inoculations. Après 9 jours, le sérum apparaît faiblement, mais certainement doué de propriétés antivirulentes, tandis que le vaccin se montre aussi actif, mais cependant un peu plus lentement actif que du vaccin normal. Après 10 jours et après 11 jours, sans différence appréciable d'une journée à l'autre, le sérum est assez antivirulent et le vaccin a perdu beaucoup de sa virulence. Après 12 jours, le sérum est très antivirulent et le vaccin a perdu presque toute activité virulente. Enfin, après 13 jours, le sérum se montre très fortement antivirulent et le vaccin a perdu toute trace de virulence. Dans cet exemple, de 9 à 13 jours après les inoculations, la virulence du vaccin intra-dermique diminue quotidiennement à mesure que s'accroît le pouvoir antivirulent du sérum; quand il atteint son plus haut degré, elle a complètement disparu.

Après avoir ainsi constaté la parfaite concordance des deux phénomènes, développement du pouvoir antivirulent du sérum et disparition de la virulence du vaccin intra-dermique, nous avons cherché si, en modifiant la date d'apparition de l'un d'eux, on faisait varier également celle de l'autre. Nous connaissions le moyen de faire apparaître plus ou moins prématurément le second de ces deux phénomènes : d'après les recherches exposées dans notre second mémoire, l'*Immunité consécutive à l'inoculation sous-cutanée du vaccin*, nous savions qu'il s'écoule toujours environ 12 jours entre la vaccination sous-cutanée et la disparition de la virulence de l'éruption ; suivant que l'inoculation sous-cutanée précède, à trois, quatre, cinq, six, sept jours d'intervalle, les inoculations sous-épidermiques, elle rend plus précoce de trois, quatre, cinq, six, sept jours la disparition de la virulence du contenu des vésicules vaccinales. Nous avons donc réalisé les expériences suivantes :

Une génisse est d'abord saignée, puis reçoit du vaccin en injection sous-cutanée. Trois jours après, avec du vaccin de même provenance, elle est inoculée sous l'épiderme par de nombreuses incisions. Depuis cinq jours pleins jusqu'à douze jours écoulés après ces inoculations sous-épidermiques, elle est quotidiennement saignée, et quotidiennement aussi on recueille sur l'animal du vaccin intra-dermique. Après 5 jours, le sérum paraît à peine très faiblement antivirulent, le vaccin est très virulent;

après 6 jours, les résultats sont exactement semblables; après 7 jours, le sérum est faiblement mais certainement antivirulent, le vaccin a sensiblement perdu de sa virulence; après 8 jours, mêmes résultats; après 9 jours le sérum se montre fortement antivirulent, le vaccin a perdu toute activité virulente; les jours suivants, le sérum se montre encore plus fortement antivirulent, le vaccin demeurant inactif. Dans cette expérience, comme dans l'expérience X *bis*[1], le vaccin a perdu sa virulence douze jours après l'inoculation vaccinale sous-cutanée. C'est aussi douze jours après cette inoculation que le sérum s'est montré fortement antivirulent, c'est-à-dire neuf jours seulement après les inoculations sous-épidermiques. Sans que l'éruption vaccinale ait été modifiée morphologiquement, sans qu'elle ait différé de l'éruption observée sur un animal témoin, inoculé sous l'épiderme à la même heure, avec le même vaccin, les deux phénomènes de l'apparition du pouvoir antivirulent du sérum et de la disparition de la virulence du vaccin intra-dermique ont été tous les deux en avance de trois jours sur la date habituelle, parce qu'une inoculation sous-cutanée a précédé de trois jours les inoculations sous-épidermiques. Cette expérience fait bien voir le lien de concordance qui réunit les deux phénomènes.

Dans une autre expérience, une génisse est d'abord saignée, puis reçoit du vaccin sous la peau. Après un intervalle de quatre jours, elle est inoculée sous l'épiderme, avec le même vaccin, par le procédé habituel des incisions multiples. Depuis quatre jours pleins jusqu'à dix jours écoulés après ces inoculations sous-épidermiques, elle est quotidiennement saignée et, quotidiennement aussi, on recueille du vaccin intradermique. Après 5 jours, le sérum se montre à peine antivirulent, le vaccin est très actif; après 6 jours, il en est de même; après 7 jours, le sérum est faiblement antivirulent, le vaccin paraît un peu moins actif; après 8 jours, mêmes résultats; après 9 jours, le sérum se montre fortement antivirulent, le vaccin a perdu toute activité virulente. Comme l'inoculation sous-cutanée avait précédé de quatre jours les inoculations sous-épidermiques, nous nous attendions, au début de l'expérience, à voir les deux phénomènes de l'apparition du pouvoir antivirulent du sérum et de la disparition de la virulence du

1. Ces *Annales* 1898, p. 839.

vaccin devancer de quatre jours la date habituelle. En fait ils sont survenus treize jours après l'inoculation sous-cutanée, neuf jours après les inoculations sous-épidermiques, et n'ont donc devancé la date habituelle que de trois jours seulement. Cet écart de 24 heures entre le résultat attendu et le résultat observé n'excède pas les limites de temps entre lesquelles nous avons vu osciller la manifestation des deux phénomènes; le lien qui les unit n'en devient que plus apparent.

Existe-t-il entre ces deux phénomènes une relation de cause à effet ? Les expériences précédentes ne permettent pas de l'affirmer sans réserve; mais c'est, croyons-nous, une hypothèse légitime d'envisager la disparition de la virulence du vaccin comme la conséquence de l'apparition des propriétés antivirulentes du sang et de supposer que le plasma sanguin, dans l'épaisseur du derme, exerce la même action que le sérum *in vitro* sur le virus vaccinal. Le fait à retenir, c'est que l'activité virulente du vaccin commence à décroître au moment où le sang commence à acquérir ses propriétés antivirulentes ; elle a complètement disparu quand celui-ci est devenu manifestement antivirulent.

Cette notion de la simultanéité des deux phénomènes nous a aidés, plus haut, à supposer que la substance antivirulente apparaît dans le sang du cochon vacciné, un ou deux jours plus tôt que chez la génisse : nous n'avions pas fait de recherches directes sur le sérum du cochon, mais nous avions constaté [1] qu'après l'inoculation vaccinale sous-cutanée l'activité virulente du vaccin intradermique disparaît chez cet animal un ou deux jours plus tôt que chez la génisse.

4° *Début de l'immunité*. — On juge que l'homme et les animaux sensibles à la vaccination possèdent l'immunité vaccinale quand les inoculations sous-épidermiques qui leur sont faites, avec du vaccin de virulence éprouvée, demeurent sans exception stériles et ne provoquent pas la moindre réaction locale. Cette définition est celle de l'immunité complète, car il y a des degrés dans l'immunité vaccinale, et même l'immunité complète à laquelle aboutit l'inoculation, si minime que soit la quantité du virus inoculé, ne se développe jamais que progressivement et par degrés, comme nous l'avons montré dans notre premier travail. Nous avons fait voir que, chez la génisse vaccinée par inoculation sous-cutanée,

1. Ces *Annales*, n° du 25 décembre 1898.

l'immunité n'est complète qu'après huit jours pleins : à ce moment toutes les inoculations sous-épidermiques demeurent stériles. A première vue, il semble qu'il n'y ait pas de relation entre le début de la période d'immunité et l'apparition de la substance antivirulente dans le plasma sanguin; ce dernier phénomène semble plus tardif, puisqu'il ne devient très manifeste que douze jours environ après l'inoculation.

Mais il ne faut pas oublier que les propriétés antivirulentes du sérum, très apparentes douze jours après l'inoculation, commencent à se révéler, dans les jours qui précèdent, par des indices de plus en plus certains : la fabrication de la substance antivirulente par l'organisme exige plusieurs jours avant que le sang contienne cette substance en notable quantité. Il faut se souvenir surtout que la naissance des vésicules vaccinales, aux points d'inoculation, est toujours précédée d'une période d'incubation de quatre jours environ : c'est précisément l'intervalle de temps dont le début de l'immunité semble précéder la manifestation du pouvoir antivirulent du sérum. Si l'on tient compte de ces deux données et particulièrement de la dernière, voici l'interprétation que nous croyons légitime : en réalité, huit jours après l'inoculation vaccinale sous-cutanée, quand la génisse paraît posséder l'immunité complète, sa peau ne constitue pas encore un terrain stérilisé pour la graine qu'on y ensemence, mais tout se passe comme si déjà ce terrain était stérile, puisqu'il le deviendra avant que la graine ensemencée ait eu le temps de sortir du sol ou, plus exactement, de provoquer une réaction appréciable.

En résumé, l'immunité est complètement acquise quand le sérum est devenu fortement antivirulent : l'apparition de la substance antivirulente dans le plasma sanguin marque à la fois la fin de l'activité du vaccin intradermique et le début de la période d'immunité.

On sait que, chez l'homme, l'immunité survient plus tardivement, après l'inoculation vaccinale, que chez la génisse. Comme exemple, l'un de nous a observé une jeune femme qui, portant au bras gauche deux pustules vaccinales, a pu, tout près de 9 jours pleins après cette vaccination, être une seconde fois inoculée par trois piqûres au bras droit, et présenter trois nouvelles et très belles pustules de vaccine légitime. C'est pourquoi nous supposons, comme nous l'avons indiqué plus haut,

que, dans l'espèce humaine, l'apparition de la substance antivirulente du sérum, après la vaccination, est un peu plus tardive que dans l'espèce bovine, mais le fait est à vérifier.

IV

ÉPOQUE DE DISPARITION DE LA SUBSTANCE ANTIVIRULENTE DU SÉRUM DES VACCINÉS

L'époque où disparaît la substance antivirulente du sérum des vaccinés doit, comme la date de son apparition, être l'objet d'une recherche particulière chez chacune des espèces sensibles à l'infection vaccinale ou variolique. La voie d'inoculation sous-épidermique, sous-cutanée ou intraveineuse, la qualité et la quantité du virus introduit dans l'organisme sont des conditions qui vraisemblablement peuvent avancer ou retarder le moment de cette disparition. La difficulté de conserver en observation, pendant de longs mois, des animaux tels que des génisses ou des chevaux ne nous a pas permis d'analyser, comme nous l'aurions voulu, l'influence de ces conditions. Nous avons donc cherché seulement à étudier l'époque de disparition de la substance antivirulente dans ses rapports :

1° Avec la date de l'inoculation virulente ;

2° Avec la fin de la période d'immunité.

Nous exposerons simultanément les résultats incomplets de ces deux recherches :

Un cheval, vacciné par quatre inoculations sous-épidermiques, fut saigné six mois après la vaccination et nous donna un sérum très antivirulent.

Une jument, vaccinée par quatre inoculations sous-épidermiques, fut saignée dix mois et demi après la vaccination et nous donna un sérum doué d'un pouvoir antivirulent très affaibli. Cette jument, réinoculée, douze mois après la première vaccination, par quatre nouvelles piqûres, deux au périnée et deux aux naseaux, présenta une éruption de vésicules incomplètement développées, méritant le nom de *vaccinoïde* et témoignant par son caractère avorté d'un certain reste d'immunité.

Un cheval et une jument, vaccinés par quatre inoculations sous-épidermiques, furent saignés dix-neuf mois après la vaccination et fournirent un sérum qui ne se montra nullement antivirulent. Ils furent alors réinoculés, par quatre nouvelles piqûres, avec le même vaccin que la jument de l'expérience précédente, et présentèrent une éruption vaccinale fort belle, aussi complètement développée que sur un terrain vierge. L'un de ces deux ani-

maux, saigné dix-sept jours après la revaccination, donna un sérum très antivirulent (voir la fig. 2).

Une jument que M. Chauveau avait vaccinée par inoculation intraveineuse fut saignée trois fois par M. Nocard, successivement deux mois, neuf mois et douze mois après la vaccination. Le sérum de deux mois était très antivirulent; le sérum de neuf mois avait un pouvoir antivirulent manifeste, mais notablement moindre ; enfin, celui de douze mois n'en fit plus voir que des traces. Cependant l'animal, réinoculé aussitôt après la dernière saignée, avec du vaccin de virulence éprouvée et par six scarifications, ne présenta aucune réaction locale : il possédait encore l'immunité.

Un cheval, à qui M. Chauveau avait fait une injection intra-veineuse de virus variolique, fut saigné trois fois par M. Nocard, successivement trois mois, neuf mois et treize mois après cette inoculation. Le sérum de trois mois se montra très antivirulent (voir la fig. 7) ; celui de neuf mois l'était à peine moins ; celui de treize mois ne l'était plus que très peu. Les inoculations vaccinales sous-épidermiques faites à l'animal, aussitôt après la dernière saignée, ne donnèrent aucun résultat : il possédait encore l'immunité.

Il nous arriva, voulant obtenir du sérum de cheval neuf, de saigner un cheval appartenant à un médecin vétérinaire et qui, depuis douze ans que son maître le possédait, n'avait pas été malade un seul jour; nous étions en droit de croire que ce cheval n'avait pas eu le *horse pox*, qu'il était indemne de toute contamination vaccinale. Cependant son sérum se montra plus antivirulent vis-à-vis du vaccin que le sérum d'un autre animal vacciné depuis deux mois par inoculation intra veineuse. Il nous sembla dès lors que ce cheval devait posséder l'immunité vaccinale, et deux essais d'inoculation d'un vaccin éprouvé montrèrent qu'il en était ainsi. Cette immunité provenait sans doute d'une inoculation accidentelle passée inaperçue (son maître avait assez souvent occasion de manier du vaccin) et, dans ce cas, nous avions fait ce qu'on pourrait appeler le *séro-diagnostic* de l'immunité vaccinale.

Trop peu nombreuses pour permettre des conclusions sans réserves, ces recherches font cependant voir que, chez le cheval, la durée de la période d'immunité est assez courte et peut ne pas dépasser un an ou un an et demi. Elles font voir aussi que, chez cet animal, quelle que soit la voie d'introduction dans l'organisme du virus vaccinal ou variolique, le pouvoir antivirulent du sérum, après s'être maintenu pendant plusieurs mois, va s'affaiblissant au cours de la première année écoulée depuis l'inoculation, pour disparaître, à un moment variable, à la fin même de cette année ou pendant l'année suivante. Elles font voir enfin que l'immunité, tout en décroissant avec le pouvoir antivirulent du sérum, ne disparaît pas tout à fait avec lui. La période d'immunité, dont le début a coïncidé avec l'apparition de

la substance antivirulente, ne paraît pas avoir une durée beaucoup plus longue que la présence de celle-ci, à dose appréciable, dans le plasma sanguin; cependant, à la fin de la période d'immunité, il existe une phase pendant laquelle le sérum ne révèle plus que des traces d'action antivirulente, ou même ne se montre nullement antivirulent, au moins avec le procédé que nous employons à cette recherche, tandis que l'immunité persiste suffisante pour rendre stérile toute nouvelle inoculation sous-épidermique. En d'autres termes, chez un cheval vacciné ou variolisé, l'examen du sérum, au point de vue des propriétés antivirulentes, permet le séro-diagnostic de l'immunité, s'il donne un résultat positif; par contre, le résultat négatif de cet examen n'autorise pas à conclure à la perte de l'immunité.

Nos recherches sur l'espèce bovine se bornent aux faits suivants :

Une génisse, vaccinée sous l'épiderme, suivant le mode habituel des inoculations multiples, fut saignée cinq mois après la vaccination et nous donna un sérum très antivirulent. Une seconde génisse, vaccinée de même, fut saignée six mois après la vaccination et nous donna un sérum plus fortement antivirulent que celui de la première. Enfin, une troisième génisse, vaccinée comme les précédentes, fut saignée sept mois après la vaccination et nous fournit un sérum doué de propriétés antivirulentes beaucoup moins prononcées, mais cependant manifestes [1]. D'autre part, nous avons eu occasion de constater sur une quatrième génisse, vaccinée sous l'épiderme suivant le mode habituel, que, dix-huit mois après la vaccination, elle possédait encore l'immunité au point de ne pouvoir être réinoculée avec du vaccin de virulence éprouvée, tandis que, vingt-sept mois après la vaccination, elle fut réinoculée avec succès; elle présenta toutefois une éruption vaccinale plus hâtive dans son apparition et moins complète dans son développement que l'éruption observée chez l'animal témoin, vacciné pour la première fois à l'aide du même vaccin; en un mot, elle présenta une éruption de *vaccinoïde* témoignant d'un faible reste d'immunité.

De ces quelques faits, nous pouvons conclure seulement que, chez la génisse, la durée de la période d'immunité est peut-être un peu plus longue que chez le cheval, mais que, dans les deux espèces équine et bovine, elle est beaucoup plus courte que dans l'espèce humaine.

Chez l'homme vacciné nous avons constaté que les pro-

1. Nous devons à l'obligeance de M. Bénard et de M. Martin, propriétaires de fermes aux environs de Paris, d'avoir pu saigner ces animaux dont ils s'étaient rendus acquéreurs après la vaccination pratiquée à l'établissement de la rue Ballu.

priétés antivirulentes du sérum, tout en s'affaiblissant avec le temps, peuvent, comme l'immunité, persister pendant plus d'un demi-siècle.

Un journalier de 52 ans, atteint de pneumonie franche, fut saigné le lendemain de son entrée à l'hôpital, dans le service de l'un de nous (25 février 1897). Vacciné dans la première enfance, cet homme affirmait n'avoir jamais été revacciné et n'avoir jamais eu la variole ; cependant il avait traversé, en 1870-71, une grave épidémie de variole qui avait causé la mort de son père et de son frère, malgré que ce frère, âgé seulement de 17 ans, eût été vacciné avec succès dans l'enfance : c'est impunément qu'il leur avait donné ses soins. Dans 10 centimètres cubes du sérum provenant de la saignée, on fit baigner, pendant 48 heures, du vaccin de virulence éprouvée, tandis qu'un autre échantillon du même vaccin baignait de même dans du sérum de génisse neuve. Une génisse fut inoculée, de chaque côté du périnée, *à gauche* avec le vaccin traité par le sérum de génisse neuve, *à droite* avec le vaccin traité par le sérum de l'homme de 52 ans, vacciné seulement dans la première enfance. Après sept jours écoulés, l'aspect des deux champs vaccinaux fut celui que représente la figure 10.

L'examen de cette figure montre manifestement que le sérum de l'homme en question possédait vis-à-vis du vaccin des propriétés antivirulentes assez modérées, mais cependant certaines. A moins d'attribuer l'état particulier de son sérum à l'infection aiguë pneumococcique dont il était atteint et qui, le lendemain de la saignée, présenta une défervescence brusque de la fièvre pour aboutir à une guérison régulière, il paraît légitime de le faire dépendre de la vaccination pratiquée dans la première enfance, plus de cinquante ans auparavant.

Ce qui confirme cette interprétation, c'est que, malgré le long temps écoulé depuis l'inoculation vaccinale, l'immunité persistait : cinq jours après la saignée, l'homme fut réinoculé avec le plus grand soin, par trois piqûres au bras gauche, à l'aide de vaccin de virulence éprouvée, sans qu'il survînt, les jours suivants, la moindre réaction locale.

Que le pouvoir antivirulent du sérum puisse persister, même très affaibli, après tant d'années, le fait est surprenant, mais on aura moins de peine à l'admettre aujourd'hui que l'on connaît

ces cas de sujets guéris de la fièvre typhoïde depuis plus de 25 ans, dont le sérum présente encore la réaction agglutinante vis-à-vis du bacille d'Eberth. D'ailleurs, nous ne donnons pas comme la règle, mais plutôt comme une exception, cette longue persistance à la fois de l'immunité et des propriétés antivirulentes du sérum. Nous en avons toutefois d'autres exemples. Un

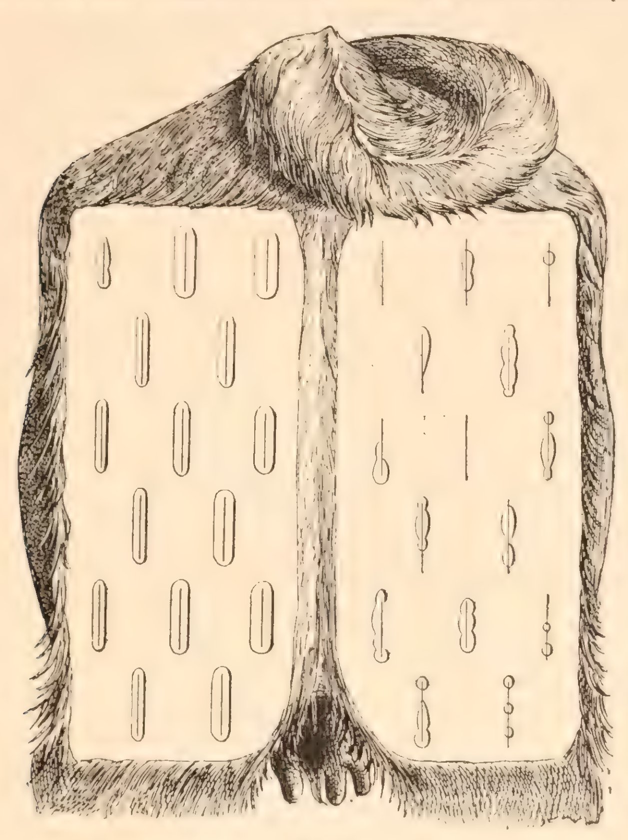


Fig. 10.

autre malade, âgé de 45 ans, n'ayant jamais eu la variole, vacciné dans la première enfance, réinoculé sans succès à trois reprises, deux fois au régiment, la dernière fois à l'hôpital, trois mois avant son entrée dans le service de l'un de nous, possédant par conséquent l'immunité, fut saigné et nous donna un sérum qui, par comparaison avec du sérum de génisse neuve, se montra antivirulent, très faiblement il est vrai. Une femme

de 22 ans, dont il sera encore question plus loin, vaccinée dans l'enfance, jamais revaccinée et n'ayant pas eu la variole, possédait l'immunité à son entrée dans le service de l'un de nous, puisqu'elle y fut réinoculée avec soin, par deux piqûres à chaque bras, à l'aide de vaccin éprouvé, sans présenter de réaction locale ; trois semaines après cette réinoculation stérile, elle fut saignée et nous fournit, comme le malade précédent, un sérum doué de propriétés antivirulentes modérées, mais certaines.

Dans les trois exemples qui précèdent, on voit coïncider avec le maintien de l'immunité la persistance du pouvoir antivirulent du sérum, d'ailleurs plus ou moins atténué. Cette coïncidence n'existe pas toujours ; comme nous l'avions déjà observé sur le cheval, nous avons vu, chez l'homme, l'immunité demeurer tandis que le sérum ne se montrait plus antivirulent, au moins dans les conditions de notre examen. Un homme de 42 ans, vacciné dans l'enfance, et qui, à l'âge de 14 ans, aurait eu la variole (?), fut réinoculé sans succès à trois reprises, la troisième fois dans le service de l'un de nous ; cependant le sérum provenant d'une saignée qui lui fut faite deux jours avant cette dernière inoculation ne se comporta pas, vis-à-vis du vaccin, autrement que du sérum de génisse neuve. Un autre homme, âgé de 40 ans, vacciné dans l'enfance, fut de même réinoculé sans succès, par deux fois, à sept jours d'intervalle, après son entrée à l'hôpital ; cependant le sérum provenant de la saignée qui précéda ces deux séries d'inoculations stériles ne se montra nullement antivirulent et ne se distingua pas du sérum de génisse neuve.

Ainsi l'immunité peut persister au point de rendre stérile toute nouvelle inoculation sous l'épiderme, alors que le pouvoir antivirulent du sérum a disparu. A plus forte raison nous devions nous attendre à trouver dépourvu de propriétés antivirulentes le sérum des sujets chez qui l'immunité très affaiblie, devenue insuffisante pour mettre obstacle à de nouvelles inoculations, ne se manifestait plus que par les modifications plus ou moins accentuées de l'éruption vaccinale, comprises sous le nom de *vaccinoïde*. C'est ce que nous avons vérifié chez huit malades.

Un homme de 56 ans, vacciné seulement dans l'enfance, réinoculé par trois piqûres au bras gauche, présenta, sept jours après, une éruption vaccinale réduite à trois petites papules rouges, dont deux légèrement saillantes,

portant une minime croûte à leur centre, et la troisième à peine visible.

Un second malade, âgé de 53 ans, vacciné dans l'enfance, cinq fois réinoculé sans succès, présenta, après une sixième réinoculation par trois piqûres au bras gauche, deux petites papules avec rougeur périphérique et croûtelle centrale.

Un troisième sujet, âgé de 48 ans, vacciné seulement dans l'enfance, fut réinoculé par trois piqûres au bras gauche, et présenta, sept jours après, trois petites papules très rouges, légèrement saillantes, sans vésicules à leur sommet, de trois à quatre millimètres de diamètre environ.

Un quatrième sujet, âgé de 40 ans, vacciné dans l'enfance et plusieurs fois réinoculé, avec un seul succès remontant à 12 ou 13 ans, présenta sept jours après une dernière revaccination, trois minimes papules insignifiantes.

Un cinquième, âgé de 36 ans, vacciné seulement dans l'enfance, présenta, sept jours après la revaccination, de petites vésicules mesurant moins de trois millimètres de diamètre.

Un sixième, âgé de 34 ans, vacciné dans l'enfance, réinoculé sans succès un an auparavant, fut de nouveau réinoculé et présenta, comme le précédent, de très petites vésicules.

Un septième, âgé de 20 ans, vacciné seulement dans l'enfance, présenta, sept jours après la revaccination, des vésicules d'un demi-centimètre environ de diamètre.

Enfin, un dernier malade, jeune homme de 16 ans, vacciné dans l'enfance, revacciné sans succès à l'âge de 10 ans, présenta comme le précédent, sept jours après une nouvelle revaccination, des vésicules d'un demi-centimètre seulement de diamètre.

Chez tous ces hommes, le caractère plus ou moins avorté de l'éruption vaccinale témoignait de la persistance d'un certain reste d'immunité ; tous avaient été saignés au moment de la revaccination ou quelques jours avant : chez aucun d'eux, le sérum ne révéla la moindre trace de pouvoir antivirulent, il ne se distingua nullement du sérum de génisse neuve dans son action sur le vaccin.

Parmi les sujets revaccinés qui présentèrent une éruption normale témoignant de la perte complète de l'immunité, seule une femme, âgée de 44 ans, avait été saignée avant la revaccination : comme on le pouvait facilement prévoir, son sérum se montra dépourvu de toute propriété antivirulente.

Le pouvoir antivirulent acquis par le sérum après la revaccination, suivie d'une éruption plus ou moins modifiée, chez des sujets de mauvaise santé, fut le plus souvent assez faible. Chez l'un d'eux, successivement saigné deux fois, 14 jours et 27 jours après la revaccination, il avait très notablement diminué, d'une saignée à l'autre.

Chez trois hommes, guéris de la variole depuis 26, 38 et 50 ans, l'examen du sérum donna des résultats très analogues à ceux qui avaient été observés chez les sujets vaccinés. Un homme de 35 ans, jamais vacciné, qui avait eu à l'âge de 9 ans, pendant l'épidémie de 1871, une éruption de variole ayant laissé de nombreuses cicatrices, fut inoculé avec du vaccin éprouvé, par trois scarifications au bras gauche, sans aucun résultat ; le sérum provenant de la saignée qui avait précédé l'inoculation vaccinale se montra, vis-à-vis du vaccin, doué d'un pouvoir antivirulent faible, mais certain : dans ce cas, 26 ans après l'infection variolique, la conservation de l'immunité s'accompagnait de la persistance des propriétés antivirulentes du sérum. Par contre, un autre homme, âgé de 59 ans, vacciné dans l'enfance, atteint de variole à 21 ans et guéri par conséquent de cette maladie depuis 38 ans, nous fournit un exemple de la discordance entre le maintien de l'immunité et la disparition du pouvoir antivirulent du sérum : deux séries successives d'inoculations vaccinales demeurèrent chez lui sans résultat, tandis que son sérum ne se montra nullement antivirulent. Enfin, un troisième malade âgé de 59 ans, jamais vacciné, mais ayant été atteint de variole 3 ans après sa naissance, présenta, sept jours après l'inoculation vaccinale, des vésicules d'un demi-centimètre à peine de diamètre, témoignant par conséquent d'un faible reste d'immunité ; comme il était à prévoir, le sérum provenant de la saignée faite avant cette inoculation ne se montra nullement antivirulent.

Ainsi, dans l'espèce humaine, les sujets vaccinés comme les sujets guéris de la variole, avant de perdre l'immunité acquise par l'une ou l'autre de ces maladies, passent successivement par deux phases, de durée très variable : l'une où la conservation de l'immunité coïncide avec la persistance du pouvoir antivirulent du sérum, d'ailleurs plus ou moins amoindri, l'autre où ce pouvoir semble avoir complètement disparu tandis que l'immunité demeure encore suffisante pour mettre obstacle à toute nouvelle inoculation sous-épidermique. Chez l'homme, comme chez le cheval, dans la première phase de la période d'immunité, l'examen du sérum et l'étude de son action sur le vaccin peuvent servir au sérodiagnostic de l'immunité ; dans la seconde au contraire, le sérum ne se distingue plus d'un sérum

neuf, et seule l'inoculation permet de voir si l'immunité persiste.

Cette notion jette quelque lumière sur certains faits d'observation médicale. La transmission intra-utérine de la variole, de la mère au fœtus, n'est plus mise en doute et n'a rien de surprenant depuis que la possibilité du passage des éléments figurés à travers le placenta a été expérimentalement démontrée. L'enfant d'une femme atteinte de variole pendant la grossesse, ne porte pas toujours les stigmates de la maladie maternelle. S'il survit, c'est un fait reconnu que, sans aucune trace d'éruption cutanée, il peut posséder l'immunité vis-à-vis de la contagion variolique et de l'inoculation vaccinale. On a dit, dans ce cas, que l'enfant avait subi, par contagion intra-utérine, une infection variolique très atténuée. Cependant cette immunité n'implique pas l'infection du fœtus lui-même, puisqu'elle peut exister chez des enfants dont la conception est postérieure à la maladie de la mère.

Aussi nous supposons que l'immunité des enfants nés, sans trace d'exanthème variolique, d'une mère plus ou moins récemment atteinte de variole, ne témoigne pas d'une infection intra-utérine, même très atténuée, mais seulement du passage dans le sang fœtal des substances solubles antivirulentes contenues dans le sang maternel. Si nous n'avons pas eu encore l'occasion de contrôler l'exactitude de cette hypothèse en ce qui concerne la variole, nous l'avons vérifiée pleinement pour la vaccine.

Nous avons cité plus haut, parmi les cas où persistaient à la fois l'immunité vaccinale et le pouvoir antivirulent du sérum, une femme de 22 ans, vaccinée seulement dans l'enfance. Cette jeune femme, entrée à l'hôpital dans le service de l'un de nous, était enceinte de huit mois quand elle fut inoculée, le 31 juillet 1897, par deux piqûres à chaque bras, avec du vaccin éprouvé ; c'est à peine si elle présenta un peu de rougeur ecchymotique autour des piqûres, sans traces de vésicules ni de papules. Saignée le 24 août, vingt-quatre jours après cette tentative infructueuse de réinoculation, elle fournit un sérum d'aspect lactescent. Elle accoucha à terme le 1er septembre d'un bel enfant ; au moment de la section du cordon ombilical, on eut soin de recueillir le sang qui s'écoulait du bout placentaire ; il donna un sérum limpide, nullement lactescent. Dans trois éprouvettes emplies l'une du sérum maternel, l'autre du sérum

fœtal, la troisième de sérum de génisse neuve, on fit baigner pendant 48 heures trois échantillons d'un même vaccin qui furent ensuite inoculés à un même animal : tandis que le vaccin traité par le sérum de génisse neuve donna naissance à des vésicules normales, les deux autres produisirent une éruption irrégulière et avortée témoignant que le sérum de l'enfant était doué, au même degré que celui de la mère, de propriétés antivirulentes modérées, mais certaines. On tenta par deux fois de vacciner l'enfant; il fut inoculé successivement, avec grand soin, le 6 et le 14 septembre, mais sans aucun résultat.

Ainsi la substance antivirulente du plasma sanguin des vaccinés qui nous a paru arrêtée par les membranes usitées pour la dialyse, peut cependant traverser le placenta, comme elle traverse les filtres de porcelaine, et passer dans le sang fœtal. C'est une analogie de plus à signaler entre cette substance et les diverses substances agglutinantes : comme on sait, les observations de MM. Chambrelent et R. Saint-Philippe, et de MM. Mossé et Daunic, ont établi que, dans la fièvre typhoïde humaine, la propriété agglutinante peut se transmettre de la mère au fœtus ; des exemples de ce passage ont été observés expérimentalement par MM. Widal et Sicard dans l'infection éberthienne, par MM. Lannelongue et Achard dans l'infection par le *Proteus*, et par MM. Achard et Bensaude dans l'infection cholérique. Cependant ce passage n'est pas constant, et M. Achard a émis l'hypothèse que l'intensité du pouvoir agglutinant dans le sang maternel est la raison ou du moins l'une des raisons de sa transmission au fœtus. Peut-être en est-il de même de l'intensité du pouvoir antivirulent dans le sang des mères convalescentes de variole ou vaccinées.

Quoi qu'il en soit, le passage dans le sang du fœtus de la substance antivirulente du sang maternel, telle nous paraît être la condition essentielle de l'immunité congénitale. On savait, jusqu'à présent, que les femmes, en possession de l'immunité vaccinale au moment de l'accouchement, tantôt transmettent cette immunité au nouveau-né et tantôt ne la transmettent pas. On s'expliquait mal ces différences; on les comprend mieux avec l'interprétation que nous proposons et qu'il est facile de vérifier : parmi les mères en possession de l'immunité vaccinale au moment de l'accouchement, celles-là seulement sont capables de la transmettre au nouveau-né qui demeurent encore à la pre-

mière phase de l'immunité, caractérisée par la persistance des propriétés antivirulentes du plasma sanguin.

Cette immunité congénitale vis-à-vis de la vaccine est, on le sait, de courte durée. Notre interprétation fait comprendre qu'elle disparaisse avec la substance antivirulente transmise du sang maternel au sang fœtal : c'est une immunité passive, d'après la théorie d'Ehrlich. Tout au contraire, l'immunité maternelle, alors même qu'elle a débuté avant la grossesse, peut persister longtemps après la disparition de l'immunité d'emprunt du nouveau-né : il s'agit, chez la mère, d'une immunité active dont la longue durée semble liée à la modification d'ailleurs inconnue qu'a subie le derme en servant de terrain de culture au virus vaccinal.

Si la substance antivirulente, produite au cours de l'infection vaccinale, franchit la barrière placentaire, par contre nous l'avons recherchée, sans la trouver, dans l'urine des génisses vaccinées : elle ne semble pas traverser le filtre rénal ou du moins le traverse à l'état de dilution assez étendue pour échapper à notre procédé de recherche.

CONCLUSIONS

I. — Le sérum de génisse vaccinée, recueilli quatorze jours après l'inoculation, n'est pas doué seulement des propriétés immunisantes, préventive et curative, déjà signalées. Il exerce, *in vitro*, sur le vaccin une action qu'on peut qualifier d'antivirulente, puisque le virus vaccinal, après avoir baigné dans ce sérum, cesse d'être inoculé avec succès et ne produit plus ou presque plus de réaction locale.

II. — Chez l'homme et chez le cheval, l'inoculation vaccinale donne au sérum des propriétés antivirulentes comme chez la génisse; il est vraisemblable que le même résultat s'observe chez toutes les espèces animales sensibles à cette inoculation.

III. — La vaccination fait apparaître le pouvoir antivirulent du sérum, quelle que soit la voie d'introduction du vaccin dans l'organisme, que l'inoculation soit sous-épidermique, sous-cutanée ou intraveineuse, et que l'infection vaccinale s'accompagne ou non d'une éruption cutanée. Dans la vaccine sans exanthème des génisses et des chevaux inoculés par la voie sanguine ou sous-cutanée, le sérum devient antivirulent comme chez

les sujets inoculés sous l'épiderme et porteurs des vésicules caractéristiques.

IV. — Le sérum des convalescents de variole exerce sur le virus vaccinal une action antivirulente comme le sérum des vaccinés.

V. — Le sérum des animaux variolisés exerce de même sur le vaccin une action antivirulente, quelle que soit la voie d'introduction du virus variolique dans l'organisme, et que l'infection variolique s'accompagne ou non d'une éruption cutanée, qu'il s'agisse du cheval inoculé par la voie sanguine, sans exanthème consécutif, ou du singe inoculé sous l'épiderme et porteur de vésicules de variole.

VI. — La substance antivirulente du sérum de l'homme et des animaux immunisés contre l'infection vaccinale ou variolique est d'une composition très stable : elle offre une grande résistance à l'action du temps, de la lumière, de la chaleur, des moisissures et même des agents de la putréfaction; desséchée, elle supporte une température de 100°, pendant 30 minutes, sans rien perdre de son activité, et ne paraît pas complètement détruite à 125°; elle traverse les filtres de porcelaine, mais ne semble pas dialyser; elle est précipitée par l'alcool avec les matières albuminoïdes du sérum, et semble s'attacher à la globuline à l'exclusion de la sérine ; de nature encore indéterminée, elle présente de grandes analogies avec les diastases.

VII. — Les propriétés antivirulentes conférées au plasma sanguin par l'infection vaccinale ou variolique apparaissent, quelle que soit la voie d'introduction du virus dans l'organisme, après une période d'incubation variable chez les diverses espèces, mais de durée assez fixe pour chacune d'elles, n'oscillant au moins que dans d'assez étroites limites. Le sang met plusieurs jours à acquérir ses propriétés antivirulentes. Chez la génisse vaccinée, il ne les possède pleinement que de 9 à 13 jours, le plus souvent 12 jours après l'inoculation.

VIII. — Le moment où les propriétés antivirulentes du sérum deviennent très manifestes est précisément celui où le virus sous-épidermique et intradermique perd toute activité, et où commence vraiment l'immunité.

IX. — La période d'immunité consécutive à l'infection vaccinale ou variolique, de durée très variable chez les diverses

espèces, se compose de deux phases successives : une première phase où le sang conserve ses propriétés antivirulentes qui vont en décroissant, une seconde phase où le sang ne manifeste plus aucune trace de pouvoir antivirulent, tandis que la peau résiste encore à de nouvelles inoculations.

X. — Pendant la première phase de la période d'immunité, la substance antivirulente peut traverser le placenta et passer du sang maternel dans le sang du fœtus : ce passage est la condition essentielle de l'immunité congénitale.

Par contre, on ne trouve pas la substance antivirulente dans l'urine ; si elle franchit le filtre rénal, c'est à l'état de dilution assez étendue pour échapper à la recherche.

XI. — Dans l'espèce humaine, où l'immunité persiste le plus longtemps, bien que de durée très variable suivant les individus, on peut reconnaître la présence de la substance antivirulente dans le sérum plus de 25 ans et même plus de 50 ans après l'infection vaccinale ou variolique. Chez certains sujets (revaccinés), cette substance ne se montre dans le sérum que pendant quelques mois, quelques semaines, quelques jours seulement. Elle peut même n'y être décélée à aucun moment. On ne connaît encore ni le lieu et le mode de sa production, ni le lieu et le mode de sa destruction.

XII. — La production de la substance antivirulente, au cours de l'infection vaccinale ou variolique, et son apparition dans le plasma sanguin constituent une réaction de défense de l'organisme intimement liée à l'arrêt du processus morbide et au développement de l'immunité. On ne saurait encore affirmer si cette substance agit directement sur les agents infectieux, comme virulicide, ou si elle agit comme un stimulant sur les cellules de l'organisme.

SUR L'ACTION ANTITOXIQUE DU CARMIN

PAR M. LE Dr STOUDENSKY, DE SAINT-PÉTERSBOURG.

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Jusqu'à présent, on connaît deux substances (chimiquement indifférentes) qui, mélangées *in vitro* à la toxine tétanique, détruisent son action tétanigène. Ce sont le sérum antitoxique et la substance cérébrale d'un cobaye neuf, broyée et émulsionnée. On sait que l'abolition de l'action de la toxine tétanique, en présence de la substance du cerveau broyé [1], a servi de base à une interprétation toute spéciale de la pathogénèse du tétanos et de l'immunité contre cette maladie. On était prêt à supposer, dans le cerveau et dans la moelle, l'existence de substances chimiques exerçant une influence hautement spécifique sur la toxine tétanique. M. Metchikoff [2] et M. Marie [3], en analysant en détail ce phénomène, ont nié la réalité de cette influence spécifique, et démontré que la cause de la résistance de l'organisme, inoculé par le mélange de la toxine et de la substance cérébrale, est une réaction phagocytaire.

En poursuivant d'autres expériences, j'ai eu l'occasion d'étudier l'influence du carmin sur la toxine tétanique, et vu que le mélange de carmin en poudre avec la solution de la toxine ne produit pas le tétanos chez le cobaye. Il semble, en outre, que cette abolition de l'action tétanigène est due à l'englobement des grains de carmin et en même temps de la toxine, qui est fixée à ces derniers, par les leucocytes.

Dans toutes les expériences concernant cette question, la quantité de carmin était 0,5 grammes pour 10 c. c. de mélange. On mettait le carmin en suspension dans la solution physiologique de chlorure de sodium et on y ajoutait la toxine tétanique,

1. WASSERMANN et TAKAKI. *Berliner klinische Wochenschrift*, 1898.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898.
3. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898.

à raison de 10 doses mortelles pour chaque centimètre cube de mélange (la dose sûrement mortelle de la toxine était 0,003 c.c. pour 500 grammes de cobaye). Immédiatement après la préparation de ce mélange, on en injectait 1 c. c. sous la peau du flanc ou de l'abdomen du cobaye. Tous les cobayes, qui avaient reçu sous la peau 10 doses mortelles de la toxine, mélangée à l'émulsion de carmin, ou ne prenaient point le tétanos, ou n'en présentaient que des symptômes minimes et guérissables.

Tout d'abord j'ai vu que la stérilisation à 100°, à 120° et même à 60°, du carmin suspendu dans la solution physiologique, lui faisait perdre sa propriété antitétanotoxique, tandis que le chauffage, à sec et en tubes clos, ne la détruisait pas. On a vu ensuite que la macération du carmin dans l'eau distillée, à la température ordinaire pendant vingt-quatre heures, l'affaiblissait aussi notablement. Et on pouvait se demander si la macération par l'eau n'enlevait pas au carmin quelque substance chimique, qui possède elle-même (et peut-être exclusivement) la propriété antitoxique. Mais dans la macération même du carmin par l'eau distillée, on ne trouvait aucune action antitoxique.

De même la solution du carmin dans l'eau alcalinisée n'en possédait pas non plus. L'eau-mère, où on macère à chaud la cochenille, pendant la fabrication du carmin, n'empêchait point l'action de la toxine, ce qui permettait de conclure que les diverses substances azotées, qui proviennent de la cochenille et entrent dans la composition du carmin de commerce, ne prennent aucune part à son action antitoxique. La solution aqueuse de l'acide carminique [1] (qui fait la plus grande partie de la masse du carmin) détruit instantanément, comme nous l'a démontré l'expérience, la toxine tétanique; mais elle perd définitivement son action destructive après la neutralisation exacte par les alcalis. Et comme le carmin ne contient aucune trace d'acide libre quel qu'il soit, il ne reste qu'à noter ce fait que le carmin ne développe *in vitro* une action antitétanotoxique, que dans le cas où il n'a pas été ni dissous ni macéré auparavant (surtout à chaud) dans l'eau.

Si on mélange l'émulsion de carmin (non stérilisé par la voie

1. La solution aqueuse d'acide carminique pure et l'eau-mère de cochenille m'ont été fournies aimablement par M. Prinvault, fabricant de carmin à Paris.

humide) avec la toxine, et puis si on la filtre à travers le papier ou la porcelaine, le filtrat ne contient pas de toxine tétanique. Donc le carmin fixe la toxine. Cependant, il ne la détruit pas, car la macération prolongée du résidu par l'eau distillée donne de nouveau un mélange toxique. Pourquoi donc le résidu contenant la toxine non détruite ne donne pas le tétanos?

Quand on injecte, sous la peau d'un cobaye, le mélange de la toxine avec le carmin, on observe une réaction locale assez intense. Il se forme au point d'inoculation une tuméfaction indurée telle qu'elle ne s'observe jamais après l'injection du carmin seul. Si on retire, à l'aide d'une pipette, un peu de l'exsudat, et si on l'examine sous le microscope, on observe, d'abord, pendant les premières heures, les grains libres du carmin, et beaucoup de leucocytes, remplis par les grains du carmin. Peu à peu, les leucocytes, bourrés de carmin, deviennent de plus en plus nombreux, de telle sorte qu'après 60-70 heures presque toute la masse du carmin est envahie par une foule de leucocytes. Même les petits tas de carmin, qui restent encore libres, sont toujours entourés par une couche épaisse de leucocytes. Bref, on observe la réaction leucocytaire et l'englobement lent mais sûr de toute la masse du carmin. Et il devient très vraisemblable que la toxine tétanique, non détruite chimiquement, n'en perd pas moins son action, vu qu'elle est englobée en même temps que les grains du carmin par les leucocytes.

L'action antitoxique *in vitro* du carmin en poudre ne se borne pas à la toxine tétanique. La toxine diphtérique, mélangée au carmin et injectée sous la peau du cobaye à la dose de 10 doses mortelles, ne provoque aussi aucune intoxication.

Comme le carmin n'est pas un corps chimiquement déterminé, il est possible de rencontrer dans le commerce des carmins dépourvus de cette action antitoxique. Sur 6 échantillons, dont 2 venaient de Leipzig (Grübler) et les 4 autres étaient de Paris (Prinvault), j'en ai rencontré un qui n'agit presque pas sur la toxine tétanique, tout en conservant son action sur la toxine diphtérique. Il me semble que, pour exercer son action antitoxique, le carmin ne doit pas être préparé tout récemment.

CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE
A L'ÉTUDE DE LA TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE
De l'Immunité contre le bacille d'Éberth
ET DU POUVOIR AGGLUTINANT

PAR LE Dr PAUL REMLINGER
MÉDECIN AIDE-MAJOR DE PREMIÈRE CLASSE

(Laboratoire militaire de bactériologie de Tunis.)

Peu de temps après la découverte de Widal, lorsque la propriété agglutinante apparaissait encore comme une réaction d'immunité, nous avions pensé pouvoir résoudre, à la lueur de cette réaction, les différents problèmes afférents à l'hérédité de l'immunité acquise contre le bacille d'Eberth, et tirer de là des déductions intéressantes au point de vue de la transmission héréditaire de l'immunité en général. L'avenir n'a pas justifié ces prévisions; il est admis aujourd'hui qu'il n'existe aucune relation entre l'immunité et la propriété agglutinante, et nos expériences perdent ainsi beaucoup de leur intérêt. Néanmoins si la transmission de l'immunité a été étudiée chez les animaux vaccinés contre le tétanos (Ehrlich[1], Tizzoni et Centanni, Vaillard[2]) le bacille pyocyanique (Charrin et Gley)[3], la diphtérie (Wernicke)[4], le charbon, le choléra et le vibrion avicide (Vaillard), aucune expérience n'a été entreprise, à notre connaissance, sur la transmission de l'immunité acquise contre le bacille d'Eberth. D'autre part, la transmission héréditaire de la propriété agglutinante n'a été encore l'objet que d'un petit nombre de travaux, quelques-uns contradictoires. Ces considérations nous ont engagé à publier le résultat de nos recherches sur ces deux questions.

1. *Zeitschr. f. Hyg.* 1892 et 1894.
2. Ces *Annales*, 1896, p. 65.
3. *Comptes rendus*, sept. 1898.
4. *Institut d'hyg. de l'Université de Berlin*, 1895.

*
* *

Nos expériences ont porté sur des lapins et surtout sur des cobayes. Ces animaux étaient vaccinés contre le bacille d'Eberth à l'aide d'injections sous-cutanées à doses progressivement croissantes de cultures virulentes en bouillon peptonisé, ayant passé 15 jours à l'étuve à 37° et stérilisées ensuite à 120 degrés. Ainsi que l'a montré Sanarelli[1], l'immunité des petits animaux de laboratoire est obtenue rapidement à l'aide de ce procédé. Le sérum acquiert également très vite un pouvoir agglutinant intense (1/300, 1/400 et jusqu'à 1/500).

Ces mêmes animaux étaient éprouvés à l'aide d'injections intrapéritonéales de cultures virulentes (procédé de Sanarelli). Chaque fois, la quantité de culture injectée était la quantité strictement suffisante pour amener la mort des témoins. La contamination par voie digestive aurait présenté l'avantage de rapprocher des conditions qui s'observent chez l'homme; mais, bien que la fièvre typhoïde puisse être transmise expérimentalement par cette voie, les résultats fournis par ce mode d'inoculation sont trop inconstants pour pouvoir être utilisés.

ROLE DU PÈRE

Expérience I. — Un lapin mâle est immunisé du mois de janvier au mois de mars 1897. Au 1er mars, il supporte l'injection dans le péritoine de 5 c. c. d'une culture virulente. Son pouvoir agglutinant est de 1/300. Il est accouplé à une femelle normale et demeure avec elle pendant toute la durée de la gestation. Son immunité est entretenue pendant cette période à l'aide d'injections à doses croissantes de cultures stérilisées. Le 5 avril, la femelle met bas 3 petits. Le dixième jour après la naissance, l'un d'eux est éprouvé à l'aide de V gouttes de culture virulente et succombe à une péritonite. De même pour un 2e lapin inoculé au bout de 15 jours, et pour un 3e inoculé au bout de 20. Le sang de ces trois lapins, examiné 5 jours après la naissance, ne présentait aucune propriété agglutinante. La séro-réaction faisait également défaut dans le sang de la mère.

Répétée chez le cobaye, cette expérience a fourni un résultat de tous points identique.

Expérience II. — Un cobaye mâle est immunisé pendant les mois de septembre et d'octobre 1897, puis accouplé à une femelle à laquelle aucune immunité n'avait été conférée. L'immunisation du mâle est poursuivie pendant toute la durée de la gestation. La femelle met bas deux petits le

1. Ces *Annales*, 1892 et 1894.

10 janvier 1898. Leur sang, examiné quelques jours après la naissance, ne possédait aucune propriété agglutinante. Même absence de pouvoir agglutinant dans le sang de la mère. Au 8e jour, l'un des petits reçoit dans le péritoine III gouttes de culture virulente et succombe. Même résultat chez le second au 15e jour avec IV gouttes.

De ces deux séries d'expériences, nous croyons pouvoir conclure que le père est incapable de jouer un rôle dans la transmission de l'immunité contre le bacille d'Eberth. Ces résultats, s'ils contrastent avec ceux qui ont été obtenus par Charrin et Gley avec le bacille pyocyanique, concordent avec ceux d'Ehrlich et de Vaillard pour le tétanos, le charbon, le choléra et le vibrion avicide. Le mâle est également inapte à transmettre à ses descendants la propriété agglutinante. Cette propriété n'est pas davantage transmissible du mâle à la femelle.

ROLE DE LA MÈRE

Expérience I. — Une femelle de cobaye est immunisée du mois de décembre 1896 au mois de mars 1897. Elle arrive à supporter l'injection dans le péritoine de 5 c. c. d'une culture très virulente. Son pouvoir agglutinant devient égal à 1/300. Elle est accouplée à un mâle normal et les injections immunisantes sont suspendues. Le 22 juin, elle met bas 4 petits. Le sang d'aucun d'eux n'agglutine le bacille d'Eberth. Quinze jours après la naissance, l'un des petits est inoculé avec V gouttes de culture et survit. Le second reçoit VIII gouttes de culture dans le péritoine le 20e jour et succombe. Les deux derniers sont inoculés chacun avec X gouttes de culture à un mois : ils résistent, mais inoculés à deux mois avec XV gouttes, ils succombent l'un et l'autre en 48 heures à une péritonite à bacilles d'Eberth.

Cette femelle, dont l'immunité n'avait plus été entretenue, a mis bas à nouveau le 3 décembre 1897. Des trois petits, un seul a survécu à l'épreuve de X gouttes de culture pratiquée le 20e jour après la naissance.

Une 3e portée composée de deux petits est venue au monde le 12 mai 1898. Aucun d'eux n'avait d'immunité. Or à cette époque, la mère supportait encore sans réagir des doses élevées de culture. Son pouvoir agglutinant était à peu près nul.

Expérience II. — Une femelle de cobaye est immunisée contre le bacille d'Eberth du 15 janvier au 1er mars 1898, puis accouplée à un mâle normal. L'immunisation est dès lors suspendue. Le 8 mai elle met bas 3 petits. Aucun d'eux ne présente la réaction agglutinante. L'un de ces petits, inoculé le 5e jour après la naissance, résiste. Un second, éprouvé le 18e jour, résiste également ; mais un troisième, inoculé au bout d'un mois, succombe. L'un des deux rejetons qui avaient triomphé d'une première inoculation est éprouvé sans plus de succès au 40e jour ; mais l'autre, inoculé à la même date, succombe à une péritonite à bacilles d'Eberth.

L'immunité de la mère n'est plus entretenue, le pouvoir agglutinant

baisse rapidement. Au 1er juillet 1898, il n'était plus que de 1/50. Le 12 septembre, cette femelle met bas deux petits. Ni l'un ni l'autre n'a résisté au 20e jour à une injection intrapéritonéale de X gouttes de culture. La mère, éprouvée en même temps avec 4 c. c., n'a présenté aucune réaction.

Une femelle de cobaye immunisée contre le bacille d'Eberth avant la conception confère ainsi à ses rejetons une immunité réelle, mais fugace. Cette immunité ne couvre guère la descendance pendant plus d'un mois après la naissance, et, d'autre part, son action se limite à la portée qui suit immédiatement la vaccination. La propriété agglutinante ne paraît pas transmissible dans ces conditions.

Les résultats sont légèrement différents si l'immunisation de la mère, au lieu d'être interrompue dès la conception, est poursuivie pendant la gestation. Cette expérience est délicate à réaliser. Les avortements sont fréquents, et parfois c'est le bacille d'Eberth lui-même qui est transmis de la mère au fœtus. En n'injectant pendant la gestation que des quantités de toxine peu considérables, on obtient cependant dans quelques cas heureux qu'elle soit menée à bonne fin. Témoin les deux observations suivantes :

Expérience I. — Une lapine fortement immunisée contre le bacille d'Eberth est accouplée au commencement de février 1898 à un mâle normal. L'immunisation de la mère est poursuivie avec prudence pendant toute la durée de la gestation. Le pouvoir agglutinant se maintient à 1/400. Elle met bas quatre petits le 13 mars. Le sang de trois d'entre eux présente très nettement la réaction agglutinante. Le pouvoir agglutinant est cependant beaucoup moins intense que chez la mère (1/40 chez l'un des petits lapins, 1/30 chez les deux autres, au lieu de 1/350 à 1/400 chez la mère). Le sang du 4e lapin ne donne aucune réaction. Cet animal est très chétif; il meurt le 3e jour après la naissance. Les organes ne présentaient aucune lésion macroscopique, mais le sang du cœur, la pulpe hépatique et splénique ensemencées donnaient du B. d'Eberth en culture pure. Les trois survivants sont inoculés, savoir l'un au dixième jour avec V gouttes de culture, le 2e au vingtième avec VIII gouttes, le 3e au vingt-cinquième avec X. Tous ont résisté. Ces animaux ont été éprouvés à nouveau simultanément au 35e jour; un seul a succombé. Les deux autres inoculés au 50e jour avec une dose de culture un peu forte (un demi-centimètre cube) ont succombé alors à une péritonite à bacilles d'Eberth.

Expérience II. — Une femelle de cobaye fortement immunisée contre la fièvre typhoïde est accouplée au commencement de janvier 1898 à un mâle indemne de toute immunisation. Pendant la gestation, l'immunité est entre-

tenue avec de grandes précautions. Le 17 avril, la femelle met bas 5 petits. L'un d'eux ne vécut que quelques heures et ne put être examiné. Les quatre autres présentaient un pouvoir agglutinant variant de 1/30 à 1/40, c'est-à-dire très inférieur à celui de la mère, qui s'était maintenu aux environs de 1/200 pendant toute la durée de la gestation. L'un des cobayes reçoit dans le péritoine, vingt jours après sa naissance, XV gouttes de culture et résiste. Les deux autres sont éprouvés au 4e jour avec XX gouttes. L'un d'eux succombe; l'autre résiste : il succomba à deux mois et demi à l'injection d'un demi-centimètre cube.

L'immunisation de la mère avait été interrompue dès qu'elle avait eu mis bas. Le 13 août elle donne le jour à deux nouveaux petits. Aucun d'eux ne présentait de réaction agglutinante, ni d'immunité.

La vaccination de la mère au cours de la gestation rend ainsi l'immunité du rejeton un peu plus persistante. Même dans ces conditions, l'immunité demeure limitée à la portée en vue de laquelle la vaccination a été opérée; elle ne s'étend pas aux portées suivantes.

***

Il était intéressant de rechercher si dans la transmission de l'immunité contre le bacille d'Eberth, l'allaitement jouait un rôle analogue à celui qui a été observé par Ehrlich chez les souris vaccinées contre l'abrine, la ricine ou le tétanos. Répétant l'expérience d'Ehrlich, nous avons pu à deux reprises différentes féconder simultanément des animaux normaux et des animaux immunisés contre le bacille d'Eberth, puis après la parturition substituer une portée à l'autre.

Expérience I. — Une lapine normale et une lapine immunisée mettent bas trois petits chacune, dans les premiers jours de décembre 1897. Trois jours après la naissance de la dernière portée, le croisement des nourrices est effectué. Le pouvoir agglutinant du lait de la femelle immunisée était de 1/40 ; celui de son sérum de 1/300. Les petits lapins issus de la mère saine, puis nourris par la mère immunisée, n'ont jamais présenté de propriété agglutinante. Le sérum des lapins issus de la mère immunisée n'agglutinait pas davantage (l'immunisation avait été interrompue au cours de la gestation.)

Les résultats obtenus au point de vue de l'immunisation contre le bacille d'Eberth sont consignés dans le tableau suivant :

LAPINS NORMAUX NOURRIS PAR MÈRE IMMUNISÉE

—

Lapin n° 1. — Reçoit dans le péritoine, 15 jours après sa naissance, au 10e jour de l'allaitement par la femelle immunisée, 10 gouttes de culture virulente. Mort en 24 heures.

Lapin n° 2. — Éprouvé le 20e jour après la naissance, avec 15 gouttes de culture. Succombe.

Lapin n° 3. — Est inoculé 1 mois après la naissance, (l'allaitement venant d'être terminé) avec 15 gouttes de culture. Mort en 24 heures.

LAPINS NÉS DE MÈRE IMMUNISÉE NOURRIS PAR LAPINE NORMALE

—

Lapin n° 1. — Inoculé le même jour dans les mêmes conditions. Résiste. Résiste à 15 gouttes à un un mois. Est tué à 45 jours par un demi-centimètre cube.

Lapin n° 2. — Résiste. N'a plus été inoculé.

Lapin n° 3. — Est inoculé avec 15 gouttes, l'allaitement terminé. Résiste.

Expérience II. — Une cobaye normale met bas 2 petits le 23 février 1898, et une cobaye immunisée 3 petits le 28. Le 1er mars, les deux petits de l'animal normal sont confiés à l'animal immunisé, et deux des rejetons de ce dernier immunisé sont donnés à l'autre. Tous ces animaux ont été éprouvés simultanément le 15 mars. Les trois cobayes provenant de la mère immunisée ont reçu une quantité de culture double de celle qui était inoculée aux deux autres. Les deux cobayes nés de mère normale, mais nourris par la femelle immunisée, ont succombé au bout de 24 heures à une péritonite due au bacille d'Eberth. Le cobaye qui avait été allaité par sa mère immunisée a résisté. Des deux autres animaux, nés de mère immunisée, mais nourris par une mère normale, l'un a résisté, l'autre a succombé au bout de trois jours. Le sérum d'aucun de ces cinq cobayes ne présentait de réaction agglutinante. Le lait du cobaye immunisé agglutinait cependant dans la proportion de 1/40 et le sérum dans la proportion de 1/200.

L'allaitement par une femelle immunisée ne réussit donc à transmettre à la descendance du lapin et du cobaye ni l'immunité contre le bacille d'Eberth ni le pouvoir agglutinant. Un cobaye ou un lapin né de mère immunisée ne perd, par contre, rien de son immunité du fait de l'allaitement par une mère normale. Ces résultats concordent avec ceux qui ont été obtenus par M. le professeur Vaillard, chez le lapin et le cobaye immunisés contre le tétanos, mais ils contrastent avec ceux d'Ehrlich chez les souris vaccinées contre l'abrine, la ricine, le tétanos ou le rouget. C'est également chez la souris seulement que MM. Widal et Sicard ont observé la transmission du pouvoir agglutinant de la mère ou fœtus, par l'allaitement. Il eût donc

été intéressant d'immuniser des souris contre le bacille d'Eberth et de répéter dans ces conditions l'expérience d'Ehrlich. A réaliser cette expérience, nous avons malheureusement éprouvé les plus grands mécomptes (absence de fécondation, avortements, mort prématurée des petites souris), et, après de nombreuses tentatives infructueuses, nous avons dû y renoncer. Nos recherches présentent de ce fait une lacune que nous regrettons vivement.

* * *

Les conclusions que nous croyons pouvoir tirer de nos expériences tiennent dans les quelques propositions suivantes :

1° *Au point de vue de la transmission de l'immunité acquise contre le bacille d'Eberth :*

a) Le rôle du père est nul ;

b) Le rôle de la mère est réel, surtout lorsque l'immunisation a pu être poursuivie pendant la gestation. Même dans ces conditions, l'immunité conférée est courte et fugace. Elle ne couvre pas la descendance au delà d'un mois ou de deux. Elle ne s'étend qu'à la portée qui suit immédiatement la vaccination.

c) L'allaitement — chez le cobaye et le lapin tout au moins — ne joue aucun rôle dans la transmission de l'immunité ;

2° *Au point de vue de la transmission du pouvoir agglutinant.*

a) Le rôle du père est nul ;

b) La mère ne transmet à ses rejetons la propriété agglutinante que si l'immunisation a été poursuivie pendant la gestation. Le pouvoir agglutinant est beaucoup plus faible chez le fœtus que chez la mère. Il ne persiste pas au delà de quelques mois ;

c) La propriété agglutinante n'est pas — chez le cobaye et le lapin tout au moins — transmissible par l'allaitement.

Bien que la propriété agglutinante ne soit pas une réaction d'immunité, il existe, on le voit, une relation très étroite entre la transmission du pouvoir agglutinant et du pouvoir immunisant. On peut se demander si, en regard de la substance agglutinante, il n'existe pas dans les humeurs du typhoïdique ou de l'animal vacciné une substance immunisante, soumise absolument aux mêmes lois physiques d'osmose ou de filtration.

DU ROLE DES MOUSTIQUES DANS LE PALUDISME[1]

Par le major RONALD ROSS,
du service médical indien.

Jusqu'à l'année dernière, la découverte d'un stade libre du parasite du paludisme, problème d'une extrême importance pratique, paraissait présenter des difficultés insurmontables. Je me propose d'indiquer ici brièvement la solution de ce problème.

Dans les premiers travaux où le docteur Laveran exposait sa grande découverte de l'hématozoaire du paludisme, l'illustre savant exprimait l'opinion que les moustiques jouent le même rôle dans la propagation du paludisme que dans celle de la filariose. Cette opinion est maintenant confirmée; et il est remarquable que le docteur Laveran n'ait pas été seulement le premier à observer l'agent du paludisme, mais aussi le premier à indiquer son mode de développement en dehors de l'organisme humain.

Pour une autre question, le docteur Laveran a également vu juste. Alors que plusieurs auteurs considéraient les corps flagellés comme des formes de dégénérescence, il a prétendu, au contraire, que c'est le stade le plus avancé de l'organisme du paludisme dans le sang.

Pendant longtemps, cependant, on n'a pas réussi à élucider la fonction de ces corps singuliers; mais, en 1894, le docteur Patrick Manson, qui avait déjà démontré le rôle du moustique dans la filariose, a découvert le véritable rôle des corps flagellés. Insistant sur le fait que les flagelles sont produits seulement après la sortie du sang des vaisseaux, il est arrivé à la théorie que ce sont les agents de propagation du parasite dans quelque insecte suceur, par exemple le moustique. Manson ajoutait ainsi un argument important à ceux déjà produits par Laveran.

Frappé de la valeur de ces remarquables inductions, je me

1. Cette note a été présentée à l'Académie de médecine dans la séance du 24 janvier 1899 et a été l'objet d'un rapport de M. Laveran lu à la séance du 31 janvier.

décidai, dès 1895, à me consacrer, dans l'Inde, à la solution de la question. De nombreux moustiques, d'une espèce commune, étaient nourris sur des malades ayant des croissants dans le sang; mais quoique ces hématozoaires fussent transformés en corps à flagelles dans l'estomac des insectes, je reconnus qu'il était impossible, à cause de l'extrême délicatesse de la recherche, de suivre les flagelles libres dans les tissus. Je me déterminai alors à adopter une méthode de recherches indirecte. Des moustiques, nourris comme précédemment, étaient conservés plusieurs jours et examinés, au bout de ce temps, dans l'espoir d'y trouver un stade plus avancé des parasites. J'éprouvai le même insuccès; et, durant deux ans et demi, mes très laborieuses recherches ne me conduisirent à aucun résultat positif.

Finalement cependant, en août 1897, en examinant par cette méthode deux moustiques d'une nouvelle espèce que j'avais obtenus de la transformation de larves, et qui avaient été nourris sur un malade avec croissants, j'observai, dans les tissus de l'estomac, ou, plus exactement, de l'intestin moyen, certains corps arrondis qui contenaient *indiscutablement* le pigment typique du paludisme. Je pensai que l'évolution des hématozoaires, en dehors du corps humain, cherchée depuis si longtemps, était enfin trouvée; mais malheureusement les circonstances m'empêchèrent de continuer immédiatement mes recherches[1].

Cette année (1898), j'ai été placé, par le gouvernement de l'Inde, dans des conditions spéciales pour continuer ces recherches. Pour diverses raisons, je me suis déterminé à travailler avec les parasites des oiseaux, qui, comme on le sait, sont extrêmement voisins de celui de Laveran. Après quelques insuccès préliminaires, je réussis de nouveau à produire des corps pigmentés, dans les moustiques d'une espèce déterminée, en les nourrissant sur des oiseaux parasités par des *Proteosoma* Labbé. Ces corps étaient exactement semblables à ceux précédemment obtenus chez des insectes (d'une espèce différente) nourris sur un homme qui avait des croissants dans le sang.

J'ai eu à ma disposition, en grande quantité, les oiseaux et les moustiques nécessaires à mes expériences; il m'a donc été facile de déterminer la nature des corps pigmentés. J'ai reconnu :

1. Ross. *British Medical Journal*, 18 déc. 1897 et 26 fév. 1898.

1° qu'ils ne se rencontrent jamais dans les expériences de contrôle faites en nourrissant les moustiques sur des oiseaux sains ou infectés par des *Halteridium* Labbé; 2° que ces corps croissent en dimensions de jour en jour. Ces raisons, et plusieurs autres, m'ont fait conclure que les corps pigmentés constituent un stade du développement de l'hématozoaire dans le moustique. En un mot, la théorie de Laveran et Manson était prouvée[1].

Mais il restait encore beaucoup à faire. — Il était clair que désormais les recherches devaient être conduites dans deux directions. — D'abord, il était nécessaire de fixer pas à pas l'évolution du *Proteosoma* dans le moustique, de façon à avoir un développement type pour tous ces parasites, et un guide pour la découverte des lois générales de la diffusion de la Malaria. En second lieu, il était indiqué de chercher à connaître d'une façon précise les hôtes des parasites humains et leur habitat. Ce dernier programme d'études était particulièrement attirant et promettait des découvertes intéressantes, mais je choisis le premier comme étant, en réalité, le plus important. — Poursuivre les deux à la fois était impossible à une seule personne.

M'attachant alors aux *Proteosoma*, j'ai établi les faits suivants concernant leur évolution. — Les corps pigmentés croissent rapidement à partir du jour où l'insecte a pris l'infection. Attachés à l'enveloppe externe de l'estomac, toujours immobiles, avec un contour sphéroïdal, ils perdent graduellement leur pigment en même temps qu'ils grossissent ; ils font hernie dans la cavité cœlomique ou sanguine de leur hôte ; et finalement atteignent un diamètre de 60 μ. — Cette évolution dure un temps *variable*, en rapport avec la température du milieu extérieur ; il varie de six jours, dans la saison chaude, à deux semaines ou plus dans la saison froide. — Quand ils sont mûrs, les parasites donnent naissance à deux sortes d'éléments reproducteurs ; 1° de nombreux éléments délicats, semblables à des fils, d'environ 12 à 16 μ de long, que je propose d'appeler *filaments germes* (germinal threads) ; 2° un nombre plus faible de gros corps brun foncé, de courbure variable, que je nomme *spores noires* (black spores). Ces éléments formés, l'organisme progéniteur se rompt, et ils se répandent dans les liquides circulants du moustique.

1. Voir Manson. *British med. Journal*, 18 juin 1898.

De la connaissance du rôle de ces filaments germes et de ces spores, dépend la possibilité de la prophylaxie du paludisme.

Les filaments germes sont d'une extrême délicatesse ; les spores noires sont très résistantes. Quelles sont leurs fonctions ?

J'ai dit que les uns et les autres étaient disséminés dans le sang du moustique. Ainsi, il suffit d'enlever une portion de la tête ou du thorax de l'insecte pour les trouver en grande quantité ! En les observant attentivement dans la partie antérieure du thorax d'un moustique, je m'aperçus que quelques filaments germes étaient contenus dans une cellule fortement réfringente. Plus tard, chez un autre insecte, je trouvai une grosse glande du cou formée de cellules semblables entourant un canal central. Quelques-unes des cellules de cette glande étaient chargées de « germinal threads ».

Quelle est cette glande ? Je ne le savais pas alors. Mais, par une dissection soigneuse, je reconnus que son conduit aboutit à l'extrémité de l'épipharynx, un des stylets qui servent à l'insecte pour percer la peau. *La glande est la glande venimo-salivaire du moustique.* Les germes occupent ses cellules.

La conséquence est claire. Les filaments-germes qui se trouvent dans les cellules sécrétantes, passent, avec la sécrétion de la glande, dans la blessure faite par l'insecte à la peau d'un sujet sain ; là, ils se mélangent avec le sang, et produisent l'infection.

Par conséquent, contrairement à toutes nos hypothèses, le paludisme doit être une maladie transmissible. Il restait seulement à donner la preuve définitive, c'est-à-dire à infecter de cette façon des oiseaux sains.

A la fin de juin dernier, quatre moineaux (*Passer indicus*) et un oiseau tisserand (*Ploceus bengalensis*), dont le sang, à plusieurs examens, n'avait pas montré de *Proteosoma*, étaient exposés, pendant la nuit, aux piqûres de nombreux moustiques gris nourris, plus d'une semaine auparavant, sur un moineau contenant des *Proteosoma*. Le 9 juillet, ces 5 oiseaux étaient examinés et je constatai qu'ils étaient infectés par des essaims de parasites. — Tous moururent bientôt ; leur foie et leur rate se montrèrent fortement chargés du pigment noir caractéristique de la maladie à hématozoaires des oiseaux.

L'expérience a été répétée à plusieurs reprises sur une quantité de moineaux et d'autres oiseaux. Un fort pourcentage s'est

trouvé infecté après une période déterminée d'incubation. Ainsi, de 28 moineaux primitivement sains, soumis aux piqûres de moustiques gris, préalablement nourris sur des moineaux malades, 22, soit 79 0/0, sont devenus infectés, tous avec un grand nombre de parasites, après une période d'incubation de 5 à 8 jours. J'exclus de cette statistique les oiseaux qui sont morts, avant la fin de la période d'incubation, de diarrhée et d'autres maladies auxquelles les moineaux en captivité à Calcutta sont sujets. Des 6 oiseaux qui n'ont pas pris l'infection dans le cours de cette expérience, un a été soumis à une seconde épreuve, qui a donné un résultat positif.

D'autre part, de 2 corbeaux (*Corvus splendens*) et 4 oiseaux tisserands (dont quelques-uns renfermaient des *Halteridium*, mais aucun des *Proteosoma*), un des corbeaux et tous les tisserands ont montré une forte infection à *Proteosoma*, 9 ou 10 jours après avoir été piqués par des moustiques gris préalablement nourris sur des moineaux avec *Proteosoma*.

Enfin, de 5 moineaux qui primitivement renfermaient quelques rares *Proteosoma*, 4 ont montré une nouvelle et plus intense infection, une semaine après avoir été soumis à une épreuve semblable.

Je n'ai pas réussi à transmettre le *Proteosoma* des moineaux aux « mainas » (*Acridotheres tristis*) et à quelques autres oiseaux.

Chez tous les oiseaux où les parasites apparaissaient après l'expérience, l'invasion présentait un caractère tellement constant et net, qu'il n'est pas possible de douter que l'infection est bien due aux moustiques. Le sang des oiseaux expérimentés était examiné avant l'expérience et plusieurs fois après. L'évolution des parasites est toujours la suivante. Le sang reste sans un seul *Proteosoma* (excepté dans le cas des 5 moineaux qui, avant l'expérience, en contenaient quelques-uns) jusqu'au 5e, 6e, 7e ou 8e jour après l'expérience, et alors on trouve un ou deux parasites dans toute une prise de sang. Le jour suivant, invariablement, on constate que le nombre des parasites a fortement augmenté; ce phénomène continue pendant un petit nombre de jours et, dans presque tous les cas, les parasites deviennent si nombreux qu'on peut en compter de 10 à 60 et même plus dans le seul champ d'une lentille à immersion homogène, et que j'ai observé souvent jusqu'à 7 parasites dans un

globule. Les seules exceptions sont celles du corbeau et des 5 moineaux préalablement infectés, chez lesquels le nombre des parasites n'a jamais dépassé un par champ, ce qui, néanmoins, est encore un nombre élevé pour les *Proteosoma*.

La plupart des oiseaux meurent et montrent non seulement la pigmentation caractéristique du foie, mais aussi une teinte d'encre du sang lui-même. Chez les rares oiseaux qui guérissent, le nombre des parasites décroît rapidement.

Durant la plupart de ces expériences, un grand nombre d'oiseaux sains ont servi de contrôle; ils étaient préservés la nuit des piqûres des moustiques, en liberté dans le laboratoire, par une moustiquaire. Un seul de ces oiseaux s'est montré infecté à un second examen; et dans ce cas, les parasites étaient si rares que je pense qu'ils m'avaient échappé à la première observation.

Les moineaux sauvages à Calcutta (où ces expériences ont été faites) ne sont pas fréquemment ni, en règle générale, sévèrement infectés. De 111 examinés, j'ai trouvé des *Proteosoma* seulement chez 15, soit 13,5 0/0; dans la plupart des oiseaux malades, les parasites étaient très peu nombreux, et deux seulement montraient une moyenne de plus d'un hématozoaire par champ.

On doit aussi noter que, quand les moineaux sont une fois infectés, ils perdent rarement leurs parasites; de sorte que les hématozoaires n'apparaissent pas et ne disparaissent pas comme dans le paludisme humain; et si on n'en trouve pas à un premier examen, il y a peu de chances d'en rencontrer à un second, s'il n'est pas intervenu une infection. On a émis l'hypothèse que, dans ces expériences, les parasites étaient apparus spontanément chez les oiseaux, qui étaient devenus malades par suite de leur captivité. Cela est tout à fait impossible, et, en fait, est faux.

Les conclusions de ces expériences peuvent donc être admises. Le Dr Bignami, en se basant sur une *seule* expérience semblable, probablement moins rigoureuse qu'une quelconque des miennes, et faite plusieurs mois plus tard, a dernièrement revendiqué pour lui la priorité de toute la théorie du rôle des moustiques. Puis-je en réclamer une petite part pour les Drs Laveran et Manson dont les idées ont servi de point de départ à mes observations nombreuses, antérieures à celles de Bignami?

Nous connaissons donc le cycle complet de l'évolution des parasites du paludisme. Il n'y a pas de raison pour que l'hématozoaire humain diffère matériellement, dans son cycle évolutif, de celui des oiseaux. Les hématozoaires entrent dans l'estomac du moustique; ils croissent dans les parois de l'organe; ils donnent naissance aux filaments germes; ces filaments pénètrent dans les cellules de la glande venimo-salivaire de l'insecte, et de là sont disséminés dans les capillaires d'un sujet sain. L'infection est expérimentalement produite et le cycle est complet.

Arrivons maintenant aux *spores noires*. Ici, j'ai eu moins de succès. Ces corps sont évidemment des formes durables, capables de vivre en dehors des organismes vivants, dans le monde extérieur. Ce sont des formes de résistance. Elles ne sont pas modifiées dans le corps du moustique vivant; elles restent également inaltérées dans l'eau, après un séjour de sept semaines. D'après plusieurs expériences que j'ai faites, elles ne paraissent pas produire d'infection chez les moineaux, administrées *per os*. En nourrissant les larves de moustiques sur des fragments de moustiques morts contenant ces spores, j'ai réussi facilement à retrouver ces éléments dans le tube digestif des larves; mais ils n'étaient pas transformés, même dans le rectum.

Le D[r] Manson a émis l'hypothèse, que j'accepte, que ces corps sont capables d'infecter les larves de moustiques après une certaine période de maturation dans l'eau et à la lumière du jour, et ainsi de continuer la propagation du parasite du paludisme de génération à génération de moustiques. Nous supposons qu'ils produisent dans la larve des organismes qui mûrissent dans l'imago et y donnent de nouveau des filaments germes et des spores noires. Le D[r] Laveran m'a écrit : « Je suis de l'avis de Manson; il est bien probable que le parasite du paludisme n'a chez l'homme qu'un hôte accidentel et qu'il doit se reproduire dans le milieu extérieur (probablement à l'état de parasite du moustique) sans que son passage dans le sang humain soit indispensable. » Je pense que les spores noires remplissent cette fonction, mais ce problème très important n'est pas encore résolu.

Ces recherches étaient complètes en juillet 1898 et leurs

résultats ont été présentés à la *British Medical Association* par le Dr Manson à la fin du même mois[1]. Depuis lors, j'ai dû abandonner ces intéressants travaux.

Une œuvre considérable, capable d'occuper un ou même plusieurs savants, reste à accomplir. Il faut découvrir les hôtes nouveaux des parasites humains dans tous les pays malariques. Je pense que des hôtes différents peuvent être trouvés dans des localités différentes et que ces hôtes peuvent souvent être des espèces rares de moustiques; de sorte que là où cette espèce abonde, l'endroit est malarique; là où elle est peu nombreuse, la localité est indemne de paludisme. Je pense aussi que les larves peuvent, en certains points, se développer dans des étangs isolés, de façon que l'on puisse les exterminer facilement. Le Dr Mac Callum a fait, en Amérique, de belles observations au moment où je commençais à trouver mes corps pigmentés dans les moustiques. Ces observations tendent à montrer que les corps à flagelles sont en relation avec un processus sexuel, d'où résulte un parasite fécondé doué de nouveaux pouvoirs. Manson, se basant sur ces observations, pense que les phénomènes sexuels se passent dans l'estomac du moustique, et que l'organisme fécondé constitue mon corps pigmenté et donne naissance aux filaments germes et aux spores noires.

Grassi, travaillant tout à fait indépendamment de nous, a récemment fait de patientes enquêtes épidémiologiques qui l'ont conduit à soupçonner une espèce de moustique *Anopheles claviger* Fab., d'être l'agent du paludisme en Italie. Après avoir vu quelques spécimens de mes corps pigmentés qui leur ont été envoyés par Manson, Grassi, Bastianelli et Bignami ont réussi à produire ces corps en nourrissant cette espèce de moustique sur des hommes infectés avec des croissants, confirmant ainsi partiellement mes travaux.

Dans ces derniers mois, Bignami[2], comme je l'ai dit, prétend qu'il a réussi à donner le paludisme à un individu sain par les piqûres de moustiques provenant de localités malariques.

Cette expérience paraît confirmer mes observations sur les filaments-germes et sur l'infection des oiseaux sains par ces éléments : mais mon habitude d'expériences semblables dans

1. Voir *British med. Journal*, 24 septembre 1898.
2. Bignami. *The Lancet*, 3 et 10 décembre 1898.

l'Inde me force à reconnaître combien il est difficile de se mettre à l'abri des causes d'erreur de diverse nature, surtout quand on opère dans des localités malariques.

Malheureusement, le Dr Bignami, oubliant son ancienne hypothèse de la dégénérescence, paraît considérer que cette unique expérience, faite trois mois après que Manson a publié le résultat de mes travaux, lui donne le droit de revendiquer pour lui la théorie du rôle des moustiques. Cette revendication ne peut être admise.

Je réclame pour deux illustres savants l'honneur d'avoir édifié la théorie du rôle des moustiques : pour le Dr Laveran, qui l'a conçue; pour le Dr Manson, qui a deviné la fonction des corps flagellés et clairement indiqué la direction précise dans laquelle les recherches devaient être conduites.

Pour éviter tout commentaire erroné, qu'il me soit permis de déclarer ici que mes travaux ont été entièrement dirigés par Manson, et que j'ai eu l'assistance de ses conseils et de son influence à toute occasion ; je dois aussi remercier le Dr Laveran de m'avoir envoyé ses avis si autorisés. Quand, en mai dernier, je lui envoyai des spécimens de mes corps pigmentés du moustique, il reconnut immédiatement la vraie nature de ces éléments.

Je dois des remerciements aux Drs Daniels et Rivenburg, qui travaillent maintenant avec moi, pour leur concours. Nous n'avons pas encore trouvé le meilleur mode de coloration et de conservation des éléments parasitaires dans le moustique, et nous éprouvons surtout une difficulté particulière à préparer les glandes salivaires contenant les filaments germes.

Comme conclusion, j'émets l'hypothèse que les parasites de la fièvre du Texas et peut-être même aussi ceux du *Surra* et du *Nagana* subissent, dans les arthropodes connus comme étant les agents de ces maladies, un développement semblable à celui des hématozoaires de l'homme et des oiseaux chez les moustiques. Je considère comme probable que la malaria est communiquée à l'homme uniquement par les morsures des moustiques et peut-être d'autres insectes.

Calcutta, 31 décembre 1898.

LES MICROBES DES NODOSITÉS DES LÉGUMINEUSES

PAR M. MAZÉ

Préparateur à l'Institut Pasteur

QUATRIÈME MÉMOIRE

Dans les mémoires précédents, j'ai étudié exclusivement la physiologie et la morphologie des bactéries des légumineuses. Les faits que j'ai établis ont permis d'expliquer les relations de ces microbes avec le végétal qui les nourrit; ils comportent d'autres conclusions d'un intérêt plus pratique, car ils serviront, plus loin, à formuler une opinion précise sur l'emploi de cultures pures de bactéries ou de terres convenablement choisies, dans l'inoculation du sol.

Depuis longtemps, en effet, les agronomes ont essayé de tirer parti de la découverte d'Hellriegel et Wilfarth en répandant sur les terrains destinés aux légumineuses, les bactéries qui se fixent sur leurs racines. On a espéré favoriser de cette façon la production de nodosités et permettre à la plante de faire un large emprunt à l'azote libre de l'air.

Deux méthodes ont été préconisées dans ce but : celle de Salfeld et celle de Nobbe. Je les examinerai très brièvement en montrant les bases sur lesquelles elles reposent, et en résumant les résultats pratiques que les expérimentateurs en ont tirés. J'exposerai ensuite les nouvelles recherches que j'ai entreprises pour compléter mes résultats antérieurs et pour vérifier les hypothèses de Nobbe.

Pour introduire les bactéries des légumineuses dans les sols qui en sont dépourvus, Salfeld [1] s'adresse à de bonnes terres arables qui ont porté récemment des légumineuses; il prend de préférence celles qui ont nourri l'espèce végétale qu'il se propose de cultiver, afin de se conformer à l'observation d'Hellriegel suivant laquelle les sols de diverses provenances ne seraient pas également aptes à provoquer la formation de tubercules

1. *Biederm. Centralb.* XVIII, 219.

radicaux sur une espèce de légumineuse donnée. Ses premiers essais datent de 1887; il a opéré sur des sols tourbeux, préalablement assainis et amendés; les terrains soumis à l'expérience étaient divisés en parcelles, qui ont reçu 40 kilogrammes de trois terres différentes n° 1, n° 2 et n° 3, par are.

Les parcelles additionnées des terres n° 2 et 3 ont fourni les plus forts excédents sur les parcelles témoins, comme le montre le tableau suivant :

EXCÉDENTS DES RÉCOLTES SUR LES SOLS NON INOCULÉS.

	Terre n° 2.	Terre n° 3.	
	Féverole et pois.	Féverole et pois.	Féverole et vesce.
Graines....	67 0/0	90,3 0/0	208 0/0
Pailles.....	87,7 »	147 »	84,9 »

Depuis cette époque, Salfeld a répété ces expériences; le plus souvent avec un succès aussi brillant.

Ce mode d'inoculation a l'inconvénient d'être coûteux; il exige le transport de plusieurs tonnes de terre par hectare. C'est, en outre, une opération quelquefois peu commode dans son exécution. MM. Nobbe et Hiltner[1] ont simplifié le procédé par l'emploi de cultures pures de bactéries des légumineuses.

Les bactériologistes avaient montré déjà que les microbes qui peuplent les nodosités se cultivent facilement sur les milieux artificiels. Les cultures conservent la propriété d'envahir les racines des légumineuses, au même titre que les formes libres du sol ou les formes incluses dans les nodosités.

Pour justifier la méthode qu'il préconise, M. Nobbe part des hypothèses suivantes :

Il existe, dit-il, dans le sol, des formes neutres capables de faire pousser des tubercules sur la plupart des légumineuses et des formes adaptées à des espèces bien déterminées. D'une façon générale, l'infection des plantes se fait donc, pour les premières, surtout dans les sols incultes ou dans les terres qui n'ont pas porté de légumineuses depuis longtemps. La forme neutre se modifie si profondément par un passage sur une légumineuse, qu'elle en devient incapable d'envahir les autres espèces.

Les microbes ainsi adaptés constituent une race définie; l'espèce *bacillus radicicola* (Beyerinck) ou *Rhyzobium Pasteuria-*

1. *Land. Versuchstationen.* XLVII, 1896.

num (Laurent), comprend un certain nombre de races possédant la propriété d'envahir respectivement une espèce de légumineuse bien déterminée. Quelquefois une race est susceptible de se fixer sur des plantes différentes, botaniquement voisines; mais elle ne peut plus sur ces hôtes inappropriés emprunter de l'azote à l'atmosphère.

Il résulte de là que si l'on veut favoriser la fixation de l'azote atmosphérique par les légumineuses, il faut avant tout leur offrir les bactéries qui leur conviennent. Dans ce but, MM. Nobbe et Hiltner ont fait des cultures pures avec toutes les races microbiennes retirées des plantes culturales, et ce sont ces cultures qu'ils ont livrées au commerce sous le nom de *nitragine* (qui rend l'azote actif).

La nitragine a été essayée un peu partout dans les stations agronomiques, en France, en Angleterre, en Allemagne, en Belgique, en Suisse, etc. Partout les agronomes formulent des réserves sur la valeur pratique de ce produit. Tous réclament en général de nouvelles expériences destinées à mettre au point une pratique qui pourrait devenir une source de richesse pour l'agriculture.

Ceux qui ont tenté de vérifier les résultats de Nobbe en se plaçant comme M. Schribaux (*Agriculture pratique*, t. I, 1897, p. 813) à l'abri des germes du dehors, ont vu qu'il est extrêmement difficile d'éviter l'envahissement des plantes par les bactéries apportées par l'air ou par le sol, ce qui prouve l'énorme diffusion de ces microbes.

Ceux qui ont opéré sur de bonnes terres arables n'ont observé aucune action de la nitragine sur le rendement des cultures; les bactéries sont si abondantes dans les bons terrains qu'elles éclipsent toute influence de la part de la nitragine.

L'expérience n'a donc sanctionné que dans une mesure très restreinte les faits avancés par M. Nobbe. Quelques observateurs sont allés même plus loin. M. Dehérain, par exemple, rapporte que les essais d'inoculation qu'il a faits sur le lupin lui ont donné des résultats négatifs, bien qu'il ait fait usage de nitragine destinée aux lupins [1].

Voilà, très brièvement résumées, les conclusions enregistrées au point de vue pratique par les nombreux expérimentateurs

1. *Annales agronomiques*, 1898, p. 174.

qui ont voulu se rendre compte de l'efficacité de la nitragine. Quant aux interprétations qu'on en a données, elles sont forcément incomplètes, puisqu'on ignorait encore la physiologie des bactéries des légumineuses.

Les faits que j'ai exposés dans ces *Annales* (janvier 1897, — janvier et mars 1898) m'auraient déjà permis d'émettre une opinion suffisamment motivée sur les données qui servent de base à la pratique préconisée par M. Nobbe. Mais j'ai voulu ajouter encore quelques preuves aux arguments théoriques que j'avais déjà recueillis.

Les microbes qui peuplent les nodosités ne périssent pas avec elles ; ils se répandent dans la terre et se mêlent aux espèces innombrables qui s'y développent. Que deviennent-ils d'une saison à l'autre? Voilà ce que Nobbe ne s'est pas demandé. Il est cependant clair que ce sont eux précisément qui assurent l'infection des racines dans la suite des années. Peut-on avancer également qu'ils conservent, après des mois et des années, les propriétés de leurs ancêtres, de façon à demeurer incapables de se fixer sur d'autres espèces végétales que celles qui avaient hébergé ceux-ci? Rien ne serait moins justifié qu'une pareille déduction. On sait depuis longtemps, en bactériologie, que toutes les espèces microbiennes subissent l'influence des milieux où elles vivent. Plus que toute autre, la bactérie des légumineuses jouit de cette souplesse d'adaptation qui assure la dissémination d'une espèce et sa conservation.

Les formes qui vivent dans la terre perdent peu à peu et les propriétés, et les caractères qui rendent si facile le diagnostic de l'espèce lorsqu'on la prend dans les tubercules radicaux.

Si l'on prépare une délayure de bonne terre, et qu'on en nocule quelques centimètres cubes à des plantes végétant dans des solutions nutritives stériles, on voit apparaître les nodosités sur les racines au bout d'une quinzaine de jours. La même délayure de terre ensemencée sur une série de tubes de gélose, de façon à obtenir des colonies isolées, ne renferme aucune forme microbienne qui rappelle la forme typique de la bactérie des légumineuses, soit par ses caractères morphologiques, soit par ses propriétés physiologiques.

L'espèce n'est pourtant pas absente ; le milieu choisi était précisément celui dont j'ai donné la composition dans les

mémoires antérieurs. En présence de ce résultat, j'ai fait une longue série de passages avec toutes les espèces mélangées qui avaient donné des colonies au bout de huit jours. Je suis parvenu de cette façon à obtenir deux formes microbiennes que j'ai pu identifier avec la bactérie typique par la méthode des inoculations. Ainsi, sous l'influence d'une nutrition hydrocarbonée et azotée convenable, les formes isolées du sol ont acquis peu à peu la propriété d'élaborer la substance mucilagineuse et de fixer l'azote gazeux.

Des conditions d'alimentation analogues leur permettaient pendant le même temps d'arriver au même but par la voie naturelle, c'est-à-dire dans les nodosités des plantes inoculées avec la délayure de terre.

La propriété d'organiser l'azote gazeux paraît donc très instable chez la bactérie des légumineuses; elle s'acquiert dans les nodosités et se perd bientôt dans la terre.

On peut constater directement cette évolution physiologique dans le sol, de la façon suivante : on prend 500 grammes de bonne terre finement pulvérisée; on l'étend sur le fond d'un récipient plat de grand diamètre; on la maintient saturée d'humidité pendant toute la durée de l'expérience et on s'arrange de façon à pouvoir, à volonté, faire passer de l'air à la surface de la culture. On ensemence très abondamment sans stériliser préalablement le milieu. Dans ces conditions, on favorise la multiplication de toutes les espèces aérobies qui peuplent la terre. Au bout de huit mois, il est impossible d'obtenir des colonies qui rappellent l'aspect si caractéristique de celles que fournit la bactérie que l'on avait ensemencée. La même expérience répétée avec un sol stérilisé ne conduit pas au même résultat. Les microbes, mis à l'abri de la concurrence vitale des espèces qui peuplent la terre, possédaient encore leurs propriétés initiales au bout de huit mois.

Si donc la propriété de fixer l'azote gazeux, la plus importante évidemment de toutes celles que la bactérie acquiert dans les tubercules radicaux, se perd si rapidement dans la terre, on est en droit d'en conclure qu'il en est de même des autres, et en particulier de celles qui constituent les caractères des races, tels qu'ils ont été définis par Nobbe.

On peut même aller plus loin dans cette voie de la dégradation

de l'espèce, et lui faire perdre, par des passages réitérés sur des milieux nutritifs, jusqu'au pouvoir de donner des nodosités sur l'espèce végétale d'où elle est sortie.

Ces faits constituent, comme on le voit, des objections sérieuses à la conception de Nobbe; mais ils ne suffisent pas à la rejeter; ils prouvent tout au plus que la nature arrive à son but par une voie différente du procédé imaginé par Nobbe. Si celui-ci peut rendre des services, il faut le conserver; les inconvénients que j'ai fait ressortir peuvent être surmontés avec quelques précautions. Malheureusement les caractères des races de bactéries, au moment où on les isole des tubercules, sont loin d'être aussi tranchés que le prétend Nobbe.

Ainsi par exemple, une bactérie sortant d'une légumineuse est capable de se fixer sur un certain nombre d'autres espèces. D'ailleurs Nobbe l'avoue lui-même; mais il constate alors que si une bactérie envahit une espèce végétale différente, mais voisine de celle qui l'avait primitivement hébergée, elle ne peut plus l'alimenter en azote; elle devient en quelque sorte parasite et partant, plutôt nuisible.

Cependant, si on cultive sur un même milieu artificiel des bactéries isolées du trèfle, de la luzerne, des pois, des haricots, des vesces, des gesces, etc... toutes fixent l'azote atmosphérique; il suffit de satisfaire leurs exigences en aliments azotés et en sucre; cela prouve que toutes les fois que ces conditions sont réalisées, les bactéries deviennent capables de fabriquer de la matière azotée en partant de l'azote gazeux; elles le trouvent dans les racines de toutes les légumineuses; la seule condition est qu'elles puissent y pénétrer.

Il est bien établi en effet que les bactéries n'envahissent pas indifféremment toutes les espèces de papilionacées. M. Bréal [1] a obtenu des tubercules sur le lupin en lui inoculant le contenu d'une nodosité prise sur un pied de luzerne; mais d'une façon générale on ne peut pas provoquer la formation de tubercules sur les lupins en inoculant des bactéries sortant des plantes qui préfèrent les terrains calcaires.

Dans cet ordre de faits, les cultures sur milieux artificiels établissent entre les bactéries de provenances diverses la même démarcation que l'épreuve de l'inoculation. Les microbes des

1. *Annales agronomiques*, 1888, p. 490.

lupins, de l'ajonc et du genêt, donnent des cultures très pauvres sur des milieux préparés avec du bouillon de haricot; par contre tous ceux qui proviennent des plantes calcicoles y prospèrent d'une façon suprenante. On constate, en outre, conformément à leur origine, que les premiers s'accommodent facilement de milieux acides, tandis que l'adaptation des derniers, très longue et très pénible, exige des transitions très ménagées.

S'il est exact que les conditions d'origine identiques entraînent une parenté physiologique plus ou moins prononcée, on doit pouvoir obtenir des tubercules sur les racines de lupins en leur inoculant les bactéries de l'ajonc et du genêt. Cette expérience est facile à réaliser dans les localités où l'on dispose d'une eau calcaire et où le sol est lui-même alcalin. On n'a pas à craindre dans ces conditions de voir les germes de l'eau ou du sol apporter quelque trouble aux résultats des expériences faites avec du lupin dans du sable de carrière exempt de calcaire. J'ai opéré de cette manière à l'Institut Pasteur. Les résultats ont confirmé mes prévisions. Les lupins inoculés avec les microbes de l'ajonc et du genêt portaient des nodosités aussi grosses et aussi nombreuses que ceux qui avaient reçu la bactérie du lupin. Les racines des plantes témoins ne portaient aucun tubercule. L'ajonc et le genêt provenaient de landes incultes de Bretagne qui n'ont jamais été cultivées en lupins. Peut-on expliquer ces résultats par des considérations d'affinité botanique? Je ne le pense pas; personne ne peut soutenir que l'ajonc ou le genêt sont plus voisins du lupin que celui-ci du pois. La seule interprétation satisfaisante qu'on puisse en donner est la longue adaptation des bactéries à des sols possédant la même réaction; celles qui vivent dans les sols calcaires sont capables d'envahir toutes les plantes calcicoles indigènes; celles qui peuplent les terrains acides se fixent indifféremment sur l'ajonc, le genêt ou le lupin. D'ailleurs, ces faits s'observent annuellement dans certaines régions de la Bretagne où le lupin bleu est cultivé sous le nom de « café des champs ». Les quelques pieds que l'on sème par ci par là possèdent toujours des tubercules, dans des terrains acides qui n'ont très probablement jamais porté de lupins.

Ces faits nous mettent sur la voie de nouvelles expériences. Si la réaction du sol est la raison essentielle de l'existence de

deux grands groupes physiologiques dans les bactéries des légumineuses, il suffira d'habituer un microbe, isolé sur une plante calcicole, aux milieux acides pour le rendre capable de pénétrer dans les racines du lupin et d'y provoquer la formation de nodosités. Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que celle que j'ai rapportée plus haut. Les plantes inoculées avec une bactérie cultivée pendant huit mois sur des milieux d'acidité croissante portaient toutes des nodosités ; elles étaient situées sur les premières racines latérales ; les racines principales n'en possédaient pas ; parmi les plantes témoins au nombre de cinq, une seule portait un tubercule. Les mêmes essais effectués sur du lupin blanc végétant dans des solutions nutritives stériles, ont donné des résultats négatifs. Le lupin blanc pousse mal dans les solutions minérales ne renfermant que des traces d'azote nitrique ; il meurt après avoir développé un bouquet de six à huit feuilles ; les racines sont relativement longues; elles présentent des irrégularités, des ramifications anormales dues à la pénétration des microbes qu'on retrouve dans les cellules sur des coupes colorées ; mais ils conservent leur forme bacillaire, et ne provoquent pas de proliférations cellulaires. Quoi qu'il en soit, les inoculations pratiquées sur des plantes normalement développées dans le sable sont tout à fait démonstratives.

Je n'ai pas tenté l'expérience inverse qui aurait consisté à inoculer des pois, par exemple, avec les bactéries du lupin ; je considère que la première, plus longue et plus difficile à réaliser, est aussi plus concluante.

Comment interpréterons-nous maintenant l'influence de l'acidité sur la pénétration des microbes dans les racines?

J'ai déjà montré, dans le deuxième mémoire, que l'infection se fait par la région des poils absorbants. C'est aussi par là, on le sait, que se fait l'absorption de l'eau du sol et des sels qu'elle tient en dissolution. Si le terrain est calcaire, la réaction acide des sécrétions des racines se trouve neutralisée jusqu'à une certaine profondeur dans les tissus ; les bactéries, très sensibles à l'action des acides, profitent de cette neutralisation pour envahir le tissu cortical, attirées qu'elles sont par les sucres diffusés en cet endroit ; mais ces mêmes microbes sont incapables de pénétrer dans les racines lorsque la réaction

acide du suc extravasé n'est pas neutralisée par les bases libres ou faiblement retenues par l'acide carbonique, comme cela se passe dans les terrains acides; il faut alors des formes spécialement adaptées aux sols de cette nature; elles s'y rencontrent tout naturellement. Ainsi s'explique la classification logique et naturelle des bactéries des légumineuses en deux grands groupes : celles des terrains calcaires et celles des terrains acides.

Si l'on résume ce qui précède, on peut dire que les hypothèses formulées par Nobbe sur les bactéries des légumineuses ne sont confirmées ni par la pratique agricole, ni par les propriétés physiologiques de ces microbes.

Il n'existe pas de races étroitement adaptées à une espèce végétale donnée; il existe, comme on l'observe dans toutes les espèces microbiennes, une série de formes physiologiques douées de propriétés variables, acquises sous l'influence du milieu où elles se développent. Si l'on considère les microbes à l'état de liberté dans la terre, on peut dire qu'ils se groupent, suivant la réaction des terrains, en deux grandes catégories; les formes que l'on rencontre dans les sols acides sont seules capables de se fixer sur les plantes nettement calcifuges comme les lupins, l'ajonc et le genêt.

*
* *

Pour terminer l'examen de l'inoculation du sol par les cultures pures de microbes, il y a lieu de se demander quel est le sort réservé aux bactéries que l'on incorpore ainsi à la terre. On sait aujourd'hui que le transport des microbes d'un milieu dans un autre de composition différente est accompagné d'une période de trouble dans les fonctions de nutrition. Une certaine proportion de microbes survit à cette opération; mais ceux qui résistent en sortent affaiblis; s'ils tombent dans un sol où l'espèce est déjà abondante, ils se trouveront dans un état d'infériorité vis-à-vis des formes préexistantes déjà bien adaptées au terrain, et dans ces conditions, on n'aura pas fait un pas vers le but qu'on se proposait d'atteindre.

Si, au contraire, on les répand là où l'espèce manque, comme une plante que l'on veut acclimater, on peut assurer qu'ils ne s'y développeront pas. Le milieu ne leur convient pas, car nul coin de terre n'est à l'abri d'une espèce microbienne dont

l'habitat naturel est le sol ; l'air et l'eau en disséminent partout les germes ; et là où ils ne manifestent pas leur présence par les réactions qui les caractérisent, ce n'est pas parce qu'ils manquent, mais bien parce que les conditions nécessaires à leur développement font défaut. Il n'y a évidemment que les sols impropres à la culture qui ne puissent satisfaire à ces conditions ; il ne viendrait à aucun cultivateur l'idée d'introduire des bactéries à l'état de cultures pures dans de pareilles terres avant de leur avoir fait subir les améliorations convenables.

Celles-ci une fois réalisées, la nature se charge du reste ; des terrains marécageux ne nitrifient pas naturellement ; lorsqu'ils sont desséchés et amendés, la nitrification s'y déclare immédiatement sans que le cultivateur intervienne ; mais il est certain que l'on peut aider la nature en introduisant une grande quantité de ferments nitrifiants que les agents de dissémination n'apportent qu'au bout d'un temps plus ou moins long. L'expérience de Salfeld, sur l'inoculation du sol par les bactéries des légumineuses, montre quels sont les avantages que l'on peut tirer d'une intervention habile et opportune. Il ne s'est pas servi de cultures pures, et c'est pour cette raison qu'il a obtenu des résultats si remarquables. On peut même faire observer qu'il ne s'est pas astreint à introduire dans ses terrains les races appropriées telles que Nobbe les définit. Il s'est servi de bonnes terres de culture ; et en particulier sa terre 3 est une sorte de terreau riche provenant d'une ancienne digue qui, on peut l'affirmer, n'avait pas été cultivée en féverole depuis de longues années ; elle a fourni cependant les meilleurs résultats parce qu'elle renfermait beaucoup de bactéries dans un état physiologique convenable. Ceci ne veut pas dire que les cultures pures soient sans action dans les sols vierges préalablement amendés ; mais j'ai montré que leur emploi entraîne toujours un certain aléa dû au changement brusque des conditions de milieu et aux propriétés physiologiques instables des bactéries cultivées sur des milieux artificiels.

Les considérations précédentes s'appliquent aussi bien au microbe de « l'alinite » qu'à la bactérie des légumineuses. M. Caron, en faisant une étude comparée de la flore microbienne de différents sols, a remarqué que les terrains fertiles, en particulier les luzernières et toutes les terres cultivées en légumi-

neuses en général, renferment en abondance un bacille particulier qui paraît jouer un rôle très actif dans la dégradation des matières azotées : il les transforme rapidement en produits assimilables pour les plantes supérieures. Les terres inoculées avec ce bacille et cultivées en avoine donnent sur les témoins non inoculés un excédent de rendement de 40 p. 100. M. Caron a fait des cultures pures de ce bacille et les a introduites dans le commerce sous le nom « d'alinite ». M. Stoklasa a fait l'étude physiologique de ce microbe. Il a montré qu'il transforme les matières azotées en composés amidés et réduit les nitrates, deux propriétés qui peuvent en effet aller de pair. Ce qui est plus remarquable, c'est que dans les milieux riches en sucres, particulièrement en xylose, il fixe de l'azote gazeux.

Ces fonctions ne se contredisent pas, elles sont étroitement liées à la nature des milieux de cultures ; les deux premières s'accomplissent dans les milieux riches en azote, la seconde dans les milieux riches en hydrates de carbone; le microbe de l'alinite peut consommer indifféremment les uns et les autres; dans tous les cas, les transformations qu'il produit présentent un grand intérêt pour l'agriculture. Il n'en résulte pas que son emploi à l'état de culture pure, dans l'inoculation du sol, puisse, dans tous les cas, conduire à des résultats avantageux ; ce bacille est répandu partout ; l'introduction dans la terre d'un nombre relativement restreint de germes ne modifie en rien sa flore microbienne. Les fumures, les amendements, les drainages, les irrigations sont les opérations qui permettent seules de transformer radicalement les fermentations qui se produisent dans le sol sous l'action des bactéries.

Les bonnes espèces profitent de ces opérations culturales : si elles semblaient endormies, elles se réveillent bientôt et prennent possession d'un milieu qui leur est devenu favorable pour y accomplir leur rôle. C'est là le procédé vraiment efficace pour favoriser le travail des microbes. Il semble que l'usage des cultures pures tel qu'on le préconise actuellement ne soit pas appelé à rendre de grands services à l'agriculture ; l'expérience s'est déjà prononcée sur la bactérie des légumineuses employée sous cet état : l'avenir nous apprendra si le microbe de l'alinite mérite un meilleur accueil.

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DE L'ACTION DE LA TOXINE TÉTANIQUE
SUR LA SUBSTANCE NERVEUSE

Par J. DANYSZ
Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur.

En montrant que la toxine tétanique devenait inactive quand on la mélangeait avec de la substance cérébrale ou médullaire broyée, M. Wassermann (1) croyait avoir apporté une preuve expérimentale en faveur de la théorie d'Ehrlich sur l'action des toxines et sur la production des anti-toxines.

D'après M. Ehrlich (6), les antitoxines que l'on trouve en abondance dans le sang des animaux immunisés ne seraient qu'une surproduction des substances existant normalement dans certaines cellules de tout organisme sensible aux poisons dont l'injection à doses non mortelles (doses immunisantes) a pour résultat la formation des antitoxines correspondantes.

Cette substance, M. Ehrlich se la représente sous la forme d'un groupement moléculaire particulier (*Seitenkette*) du protoplasma cellulaire, groupement qui a un rôle à remplir dans la vie normale de l'organisme, mais qui possède en outre la propriété spécifique d'attirer et de fixer les toxines en donnant avec elles un produit neutre, comme la combinaison d'un acide et d'une base en proportions convenables aboutit à la formation d'un sel neutre.

Une molécule d'antitoxine ne peut neutraliser, dit M. Ehrlich, qu'une quantité bien déterminée et invariable de toxine.

Ainsi, dans le cas particulier de fixation de la toxine tétanique par la substance nerveuse *in vitro*, la substance fixatrice serait l'antitoxine préexistante dans les cellules nerveuses. Cette fixation aboutirait donc, d'après ces théories, à la formation d'un composé chimiquement neutre.

De là, une sorte de constance dans la combinaison, qui se

heurte tout de suite à un certain nombre de faits : c'est ainsi que, contrairement à cette notion, les quantités de toxine fixées et neutralisées par 1 gr. de substance cérébrale semblent très différentes pour les divers auteurs, et varient de 30 doses mortelles pour MM. Wassermann et Takaki à 125 pour M. Metchnikoff (2), avec le cerveau de cobaye. D'après Knorr (4), elles varient aussi avec la concentration de la toxine et les conditions de milieu : la substance nerveuse perd toute son affinité pour la toxine quand on l'émulsionne dans l'eau salée à 10 0/0.

J'ai vu aussi que les quantités de toxine fixée ne varient pas proportionnellement à la quantité de matière cérébrale : 1 gramme de cerveau de cobaye émulsionné avec 8 c. c. d'eau physiologique, mélangé avec 1 c. c. d'une toxine contenant 200 doses mortelles pour souris, et injecté aux souris 5 à 6 heures après que le mélange avait été fait, pouvait absorber et rendre inactives, à peu de chose près, 200 doses mortelles pour souris, tandis que 2 grammes du même cerveau, préparé dans les mêmes conditions et émulsionné avec 7 c. c. d'eau physiologique et 2 c. c. de la même toxine, ne fixait pas exactement 400 doses mortelles, mais un peu moins, environ 300 doses seulement.

Tous ces faits, et bien d'autres que je pourrais citer, sont bien plus d'accord avec l'interprétation née des travaux de Metchnikoff (2), de Marie (3), de Roux et Borrel (7), et d'après laquelle la fixation de la toxine sur la substance cérébrale serait assimilable au dépôt d'une matière colorante sur un tissu. S'il en est ainsi, on doit pouvoir faire varier la quantité déposée en changeant la composition du bain, et redissoudre par un bain nouveau ce que le premier a laissé déposer sur le tissu. C'est ce que j'ai essayé de faire en me servant dans ce but de l'eau physiologique, de l'eau distillée et de l'eau salée à 10 0/0.

Après quelques essais préliminaires qui ont montré que 1 gr. de cerveau de cobaye, dans de l'eau à 0,75 0/0 de NaCl, émulsionné avec 1 c. c. de toxine contenant 200 doses mortelles pour souris de 16 à 18 gr., absorbait et rendait inoffensives à peu près 195 à 200 doses mortelles pour souris, quand on leur injectait cette émulsion 5 à 6 heures après qu'elle avait été faite, j'ai broyé 3 gr. de cerveau de cobaye, qui a été réparti par parties égales dans 3 éprouvettes, et j'ai émulsionné chaque gramme de ce cerveau séparément avec 1 c. c. de toxine

TABLEAU I

ÉMULSION DANS L'EAU PHYSIOLOGIQUE

		1/2 dm.		1 dm.		2 dm.		4 dm.		8 dm.		10 dm.		20 dm.	
Témoins	1 jour après inject.	0	0	0	0										
	2 jours	—	0	=	—										
	3 —	=	—	+	=										
	4 —	≡	=		≡										
	5 —	+	≡		≡										
	6 —		+		+										
1. Liquide décanté après 5 h. de macération.	1 jour					0	0	0	0			0	0	0	0
	2 jours					0	0	0	0			0	0	—	—
	3 —					0	0	0	0			—	—	—	—
	4 —					0	0	0	0			—	—	=	=
	5 —					0	0	0	0			—	—	=	=
	6 —					0	0	0	0			—	—	=	≡
	7 —					0	0	0	0			—	=	=	+
	8 —					0	0	0	0			—	—	≡	
	9 —					0	0	0	0			—	—	≡	
2. Liquide décanté après 30 h. de macération.	1 jour			0	0	0	0	0	0	0	0				
	2 jours			0	0	0	0	0	0	—	—				
	3 —			0	0	0	0	0	0	=	—				
	4 —			0	0	—	—	—	—	≡	=				
	5 —			0	0	—	—	—	—	+	=				
	6 —			0	0	—	—	—	=		=				
	7 —			0	0	—	—	=	=		≡				
	8 —			0	0	0	—	—	—		+				
	9 —			0	0	0	0	0	—						
				d	*l*			*d*	*l*[1]						
3. Liquide décanté et dépôt après 5 jours de macération.	1 jour			—	0			—	0						
	2 jours			=	0			≡	0						
	3 —			+	0			+	0						
	4 —				0				0						
	5 —				0				0						
	6 —				0				0						
	7 —				0				0						
	8 —				0				0						
	9 —				0				0						
Témoins	1 jour	0		—											
	2 jours	=		+											
	3 —	+													
	4 —														
	5 —														

1. *d* indique les souris qui ont reçu l'injection du dépôt; *l*, celles qui ont reçu le liquide décanté.
O signifie action nulle; — action faible; = action plus forte; ≡ action forte; + mort.

TABLEAU II

ÉMULSION DANS L'EAU DISTILLÉE

		1/2 dm.		1 dm.		2 dm.		4 dm.		8 dm.		10 dm.		20 dm.	
Témoins.........	1 jour après inject.	0	0	0	0										
	2 jours	0	—	—	=										
	3 —	—	=	=	+										
	4 —	=	≡	=											
	5 —	≡	+	≡											
	6 —	+		+											
1. Liquide décanté après 5 h. de macération.	1 jour					0	0	0	0			0	0	0	0
	2 jours					0	0	0	0			0	0	—	0
	3 —					0	0	0	0			—	—	=	—
	4 —					0	0	0	0			—	—	+	=
	5 —					0	0	0	0			—	—		≡
	6 —					0	0	0	0			—	=		+
	7 —					0	0	0	0			—	—		
	8 —					0	0	0	0			—	—		
	9 —					0	0	0	0			—	—		
2. Liquide décanté après 30 h. de macération.	1 jour			0	0	0	0	0	0	0	0				
	2 jours			—	—	—	=	=	=	=	≡				
	3 —			—	—	=	≡	=	≡	≡	+				
	4 —			=	=	≡	+	+	+	+					
	5 —			=	=	+									
	6 —			—	=										
	7 —			—	=										
	8 —			—	=										
	9 —			—	=										
					+	le 13e jour.									
		d	*l*	*d*	*l*	*d*	*l*								
3. Liquide décanté et dépôt après 5 jours de macération.	1 jour	0	0	—	—	—	—								
	2 jours	0	=	=	=	=	+								
	3 —	=	+	≡	+	≡									
	4 —	≡		+		+									
	5 —	=													
	6 —	≡													
	7 —	≣													
	8 —	+													
	9 —														
Témoins.........	1 jour	0	0	—	—										
	2 jours	+	=	+	+										
	3 —		+												
	4 —														
	5														

TABLEAU III

ÉMULSION DANS L'EAU SALÉE A 10 0/0

		1/2 dm.		1 dm.		2 dm.		4 dm.		8 dm.		10 dm.		20 dm.	
Témoins	1 jour après inject.	0	0	0	0										
	2 jours	—	0	=	—										
	3 —	=	—	+	=										
	4 —	≡	=		≡										
	5 —	+	≡		+										
	6 —		+												
1. Liquide décanté après 5 h. de macération.	1 jour					0	0	0	0			0	0		
	2 jours					—	—	—	=			≡	≡		
	3 —					≡	≡	≡	≡			+	+		
	4 —					+	+	+	+						
	5 —														
	6 —														
	7 —														
	8 —														
	9 —														
2. Liquide décanté après 30 h. de macération.	1 jour			0	0	0	0	0	—						
	2 jours			—	—	=	=	=	≡						
	3 —			≡	≡	+	+	+	+						
	4 —			+	+										
	5 —														
	6 —														
	7 —														
	8 —														
	9 —														
				d	*l*										
3. Liquide décanté et dépôt après 5 jours de macération.	1 jour	0	0	0	—										
	2 jours	—	—	—	=										
	3 —	=	=	≡	+										
	4 —	=	=	+											
	5 —	=	=												
	6 —	=	=												
	7 —	=	=												
	8 —	≡	=												
	9 —	+	≡												
			+ le 17e jour.												
Témoins	1 jour	—	0	—	—										
	2 jours	+	=	+	+										
	3 —		+												

1. Comme, pour faire la troisième série d'épreuves, je n'avais à ma disposition que des souris un peu plus petites que pour la première série d'épreuves, j'ai tenu à les contrôler par des témoins de même taille, et par l'emploi de toxines qui ont subi exactement les mêmes manipulations que les émulsions et qui ont été diluées au même titre dans les différents liquides.

contenant 200 doses mortelles (*dms.*) pour souris de 16 à 18 gr.

Ces émulsions ont été laissées en repos pendant 2 heures à une température de 37°, et ensuite il a été ajouté, dans l'un des trois tubes, 8 c.c. d'eau physiologique (à 0,75 0/0 de sel); dans l'autre, 8 c.c. d'eau distillée, et dans le dernier, 8 c.c. d'une solution de sel marin à 10 0/0 dans l'eau distillée.

Les trois mélanges, de nouveau bien agités, ont été laissés en repos pendant 1 heure et ensuite centrifugés pendant 2 heures.

Après la centrifugation, on a pu recueillir dans chaque tube 5 c. c. d'un liquide clair opalescent qui a été aussitôt, c'est-à-dire 6 heures après l'extraction du cerveau, injecté à des souris [1].

Les tableaux ci-contre indiquent les doses injectées et les résultats obtenus. La même dose de chaque liquide a été injectée simultanément à deux souris.

Chacun des trois tubes contenait donc primitivement, dans 10 c. c. d'émulsion, 200 doses mortelles pour souris (*d. m. s.*) Si la substance cérébrale était restée indifférente pour la toxine, les 5 c. c. de liquide décanté devraient contenir 100 *d. m. s.*

Les injections des premiers liquides décantés, après 5 heures de macération, ont montré :

Émulsion dans l'eau physiologique : 1 c. c. du liquide décanté contient moins d'une dose mortelle de toxine, à peine une 1/2 *d. m. s.* Les 9 c. c. du liquide contiennent donc 4,5 *d. m.* 1 gramme de cerveau aura donc fixé 195 *d. m. s.*

Émulsion dans l'eau distillée : 1 c. c. du liquide décanté contient 1 *d. m.* ; 1 gramme de cerveau aura donc fixé 190 *d. m. s.*

Émulsion dans la solution saline à 10 0/0 : 0,2 c. c. du liquide décanté = 1 *d. m.* ; 9 c. c. du même liquide = 45 *d. m.* 1 gramme de cerveau a retenu 155 *d. m. s.*

Mais comme les deux souris ayant reçu 0,2 c. c. sont mortes plus rapidement que les deux témoins, il est à supposer qu'une dose moitié moins forte aurait produit le même effet que 1 *d. m.* de toxine pure. Il est donc probable que déjà après 5 heures de macération, la moitié au moins de la toxine fixée par la

1. Il est à remarquer que dans l'eau salée à 10 0/0, le mélange se fait très difficilement. La solution saline et la substance cérébrale sont à peu près de la même densité; en outre, la substance cérébrale se coagule et s'agglutine en une masse filante difficile à diviser.

substance cérébrale avait diffusé dans l'eau salée. Une expérience ultérieure a montré qu'il en était, en effet, ainsi.

Ce premier essai montre que c'est en émulsion dans l'eau physiologique que la substance cérébrale retient la plus grande quantité de toxine tétanique.

Aussitôt après la décantation des premiers 5 c. c. des liquides, une nouvelle quantité de 5 c. c. d'eau distillée, physiologique et salée à 10 0/0 avait été ajoutée respectivement au dépôt de chaque tube. Le contenu de chaque tube a été de nouveau bien mélangé, laissé ensuite en repos pendant 18 heures et centrifugé pendant 6 heures. Le dépôt formé, il a été prélevé dans chaque tube 5[1] c. c. de liquide décanté.

Si la substance cérébrale avait gardé la quantité de toxine fixée conformément aux indications de la première série d'épreuves, les deuxièmes liquides décantés ne devraient contenir que exactement la même quantité de toxine qu'il en restait dans les 4 c. c. du liquide restés mélangés au dépôt, — à savoir :

2 *d. m.* environ dans les 9 c. c. du nouveau mélange dans l'eau physiologique.

5 *d. m.* dans les 9 c. c. du nouveau mélange dans l'eau distillée.

L'épreuve de la toxicité de ces liquides sur les souris a donné, ainsi que l'indique la série 2 des tableaux, des résultats absolument différents.

Émulsion dans l'eau physiologique : 1 c. c. du liquide décanté à tué les deux souris en 5 et 6 jours. Donc, si 1 c. c. = 1 *d. m.*, la substance cérébrale aura abandonné 10 *d. m.* de la toxine précédemment fixée.

Émulsion dans l'eau distillée. — 1 c. c. du liquide décanté = 4 *d. m.*, donc la substance cérébrale a abandonné 40 *d. m. s.*

Émulsion dans l'eau salée à 10 0/0. — 1 c. c. du liquide décanté = 10 *dm.*, donc ce liquide est à peu près aussi toxique qu'une dilution de toxine au même titre dans l'eau pure. La substance cérébrale a donc abandonné dans ce cas *à peu près* toute la toxine. On ne peut pas dire que « toute la toxine » a été abandonnée par la substance cérébrale, parce que, ainsi que nous le montrera le dernier essai, on ne peut pas négliger la différence, il est vrai

1. Aussitôt aprés décantation, il a été ajoute 5 c. c. de liquide correspondant à chaque dépôt.

légère, qui existe entre ce liquide et une dilution au même titre de toxine dans l'eau salée pure.

Après la décantation faite au bout de 30 heures, on a ajouté à chaque dépôt 5 c. c. du liquide correspondant, et après cinq jours de macération, on a éprouvé, en même temps et aux mêmes doses, le liquide décanté et le dépôt.

Macération dans l'eau physiologique. — Dans le liquide décanté, on constate les mêmes résultats que dans l'épreuve précédente : l'injection d'une quantité de liquide devant contenir 4 *dm* (0,8 c. c.) reste sans effet appréciable.

Mais une quantité de dépôt qui correspond exactement à 1 *dm* de toxine pure a tué la souris avec un jour de retard sur le témoin. La toxine semble donc encore être fixée à la substance cérébrale, mais d'une façon bien moins intime.

Macération dans l'eau distillée. — Dans le liquide décanté, la dose minima mortelle est assez exactement la même que celle d'une dilution de toxine dans l'eau pure.

Le dépôt semble être un peu moins toxique que le liquide décanté. Dans les trois cas traités parallèlement, et bien que les souris aient été choisies aussi pareilles que possible, on observe dans les effets produits par 1/2, 1 et 2 doses mortelles, les mêmes différences entre la toxicité du liquide décanté et du dépôt. Les différences constatées entre l'action du dépôt et du liquide décanté et entre celle du liquide et de la solution toxique témoin, montrent que la quantité de toxine qui est restée fixée au dépôt n'est pas négligeable.

Macération dans l'eau salée à 10 0/0. — Le liquide décanté est nettement un peu moins toxique qu'une solution de toxine au même titre injectée aux témoins.

En résumant l'ensemble des résultats obtenus par cette première série d'essais, nous voyons que la majeure partie de la toxine fixée par une émulsion fraîche de la substance cérébrale est ensuite abandonnée dans les liquides de macération, et que cette diffusion est d'autant plus rapide que le liquide de macération exerce une action plus énergique et amène des modifi-

1. Le même résultat a été obtenu par M. Knorr (*l. c.* p. 364) qui a constaté qu'après six jours de macération dans l'eau physiologique, le liquide décanté ne contenait pas de toxine aux doses éprouvées par moi. M. Knorr n'a pas essayé l'action du dépôt.

TABLEAU IV

EXPÉRIENCE N° 1.

MÉLANGE DE TOXINE AVEC UNE ÉMULSION DE CERVEAU DANS L'EAU SALÉE A 10 0/0

Il a été injecté séparément le liquide décanté l. et le dépôt d.

	l. ÉMULSION	*d.* ÉMULSION	*l.* ÉMULSION	*d.* ÉMULSION	TÉMOINS — Toxine en solution dans l'eau salée à 10 0/0	
	0,025 cc	0,15 cc	0,05 cc	0,03 cc	0,025 cc	0,05 cc
1 jour après injection.	0	0	0	0	0	0
2 jours —	—	=	—	=	=	≡
3 — —	—	≡	=	≡	≡	+
4 — —	≡	≡	≡	+	+	
5 — —	≡	+	+			
6 — —	+					

EXPÉRIENCE N° 2.

MÉLANGE DE TOXINE AVEC UNE ÉMULSION DE CERVEAU DANS L'EAU DISTILLÉE CHAUFFÉE A 100° PENDANT 20′

	l. ÉMULSION	*d.* ÉMULSION	*l.* ÉMULSION	*d.* ÉMULSION	TÉMOINS — Toxine en solution dans l'eau distillée.	
	0,025 cc	0,15 cc	0,05 cc	0,3 cc	0,025 cc	0,05 cc
1 jour après injection.	0	0	0	0	0	...
2 jours —	0	...	0	...	—	≡
3 — —	0	—	0	—	=	+
4 — —	0	—	—	—	+	
5 — —	0	=	—	=		
6 — —	0	=	0	=		

EXPÉRIENCE N° 3.

MÉLANGE DE TOXINE AVEC LE LIQUIDE DÉCANTÉ D'UNE ÉMULSION DE CERVEAU CHAUFFÉ A 100° PENDANT 20′ ET MACÉRÉ PENDANT 4 JOURS

	SOLUTION DE TOXINE DANS LE LIQUIDE DÉCANTÉ				SOLUTION DE TOXINE DANS L'EAU DISTILLÉE			
	0,5 cc	0,25 cc	0,1 cc	0,05 cc	0,5 cc	0,25 cc	0,1 cc	0,05 cc
1 jour après injection.	...	...	0	0	0	0	0	0
2 jours —	≡	=	—	—	—	—	0	0
3 — —	+	≡	=	—	—	—	0	0
4 — —		≣	=	—	=	—	0	0
5 — —		≣	=	=	=	—	0	0
6 — —		≣	≡	≡	≡	—	0	0
7 — —		≣	≡	≡	=	=	0	0
8 — —		≣	≡	≡	=	≡	0	0
9 — —		≣	=	≡	≡	=	0	0
10 — —		+	—	—	+	=	0	0

cations plus rapides et plus profondes dans la constitution de cette substance.

Ces faits, qu'un changement de constitution entraîne avec lui une diminution sensible du pouvoir fixateur de la substance nerveuse, et qu'une partie de la toxine mélangée à la substance cérébrale disparaît toujours dans l'opération, quel que soit d'ailleurs l'état dans lequel se trouve cette substance, ont été confirmés par quelques épreuves faites spécialement dans ce but et dont les résultats sont exposés dans le tableau IV (p. 164).

Contrairement aux indications de Knorr, nous voyons que la substance cérébrale émulsionnée dans l'eau salée à 10 0/0 n'est pas complètement indifférente pour la toxine. En effet, quand on triture 1 gr. de cerveau de cobaye avec 8 c. c. d'eau salée à 10 0/0, et quand on ajoute à cette émulsion une fois faite 1 c. c. de toxine contenant 400 doses mortelles pour souris, les animaux, injectés avec le liquide décanté après centrifugation ou avec le dépôt, meurent avec un retard sensible sur ceux qui ont reçu la même toxine en solution dans l'eau salée à 10 0/0.

Une comparaison entre les effets produits par le liquide décanté et le dépôt, nous montre, en outre, que la quantité de toxine fixée dans ce cas par la substance cérébrale n'est pas négligeable. Le liquide décanté contient, ainsi qu'on peut le voir dans l'expérience n° 1 du tableau IV, moins de toxine que la solution au même titre dans l'eau salée : le dépôt doit donc en contenir d'autant plus ; or, 0,3 c. c. de ce dépôt ont produit exactement le même effet que 0,025 c. c. de la solution.

L'affinité de la substance cérébrale chauffée à 100° pour la toxine tétanique est encore plus prononcée que celle du cerveau traité par l'eau salée (expérience n° 2 du même tableau), et ce fait est d'autant plus intéressant que, ainsi que cela résulte de l'expérience 3 du même tableau, le liquide seul[1], décanté d'un cerveau chauffé à 100° et macéré pendant 4 jours, favorise très sensiblement l'action de la toxine.

Ce fait nouveau rend encore beaucoup plus compliquée et

1. Ce liquide a été préparé de la façon suivante : un cerveau de cobaye pesant 3,5 gr., laissé entier, a été enfermé dans un tube à essai avec 7 c. c. d'eau distillée ; le tube fermé à la lampe a été chauffé à l'autoclave pendant 20' à 100°. Le cerveau chauffé a été ensuite réduit en bouillie en secouant fortement le tube. L'émulsion a été laissée en repos pendant 3 jours ; le 4e jour elle a été centrifugée et il a été recueilli 1 c. c. de liquide clair qui a été mélangé avec la toxine et injecté aux doses indiquées dans le tableau IV, n° 3.

plus difficile la juste appréciation du phénomène de l'action du poison tétanique sur la substance nerveuse. Sur quoi se baser, en effet, dans l'évaluation de la quantité de toxine fixée par la substance cérébrale, quand le liquide de macération peut à lui seul doubler ou même tripler l'action nocive de la toxine ?

Avant d'aller plus loin, il faudrait donc déterminer la nature et le degré d'activité de cette « substance favorisante » qui, par elle-même, ne semble exercer aucune action nocive sur l'organisme, et ne peut par conséquent pas être assimilée à la *névrine* et autres produits de désassimilation qui, tout en étant très toxiques pour l'organisme, neutralisent en même temps la toxine tétanique, ainsi que cela a été constaté par MM. Roger et Josué (11).

L'ensemble des faits relatés ci-dessus peut être résumé de la façon suivante :

1° La substance cérébrale du cobaye fixe des quantités variables de toxine tétanique suivant les milieux.

2° Les quantités de toxine fixées par la substance cérébrale sont d'autant plus considérables que le liquide dans lequel a été faite l'émulsion exerce, par lui-même, une action modifiante moins énergique sur cette substance.

Cette quantité est la plus considérable dans l'eau physiologique, qui conserve le mieux la substance cérébrale dans son état normal. En représentant par le nombre 100 le pouvoir antitoxique du cerveau de cobaye émulsionné dans l'eau physiologique, nous aurions pour les autres cas à peu près les proportions suivantes :

Si un cerveau de cobaye émulsionné dans l'eau physiologique absorbe 100 parties de toxine.
le même cerveau — — — l'eau distillée absorbera 90 —
— — — — l'eau salée à 10 % — 5 —
— — bouilli dans l'eau distillée — 10 —

3° La fixation de la toxine par la substance nerveuse n'est pas permanente, ainsi que cela a déjà été admis par M. Metchnikoff. Elle diffuse dans les liquides de macération, et cette diffusion est d'autant plus rapide que ces liquides exercent une action plus énergique sur la substance nerveuse.

4° Le liquide de macération du cerveau contenant les substances solubles dans l'eau distillée à 100° exerce sur la toxine tétanique une action contraire à celle constatée pour les subs-

tances insolubles. Les substances solubles *favorisent* d'une façon bien appréciable l'action de la toxine sur les souris;

5° Ce dernier fait rend très difficile une évaluation précise de la quantité absolue de toxine qui, primitivement fixée, peut être ensuite retirée de la substance cérébrale par la macération et par des lavages successifs. Il semble que la diffusion n'est pas complète, qu'il reste donc un peu de toxine fixée à la substance cérébrale d'une autre façon que celle qui a passé dans les liquides.

Nous ne pouvons guère en ce moment insister davantage sur ce point qui exige une étude spéciale, ainsi que sur cet autre point que nous n'avons pu que noter au passage, en commentant les résultats de macération d'un mélange de cerveau et de toxine dans l'eau physiologique.

Nous avons vu, en effet, que dans ce cas la substance cérébrale a conservé jusqu'à la fin de l'expérience la majeure partie de la toxine primitivement fixée ; mais que cette fixation n'était pas de la même nature au commencement et à la fin de l'expérience. Le liquide décanté restait toujours neutre, tandis que le dépôt, *neutre au début*, est devenu *très toxique* après une macération de 5 jours.

Il est évident que la fixation ne peut pas être la même dans les deux cas, puisque les effets produits par les injections du même dépôt, pris avant et après macération, sont très différents.

Ne connaissant ni la composition chimique de la toxine, ni celle de la substance nerveuse fixatrice, nous ne pouvons guère chercher, en ce moment, à élucider *la nature des actions* que ces deux corps exercent l'un sur l'autre. Concluons seulement que *le phénomène de Wassermann ne peut, en aucune façon* et malgré quelques analogies apparentes, *être assimilé à l'action de l'antitoxine sur la toxine*, parce que *la toxine primitivement fixée* par la substance nerveuse *redevient libre in vitro* et *in vivo*. *Les mélanges neutres de toxine et de substance nerveuse* deviennent, avec le temps, ainsi que nous l'avons constaté, *de plus en plus toxiques*, tandis qu'au contraire *les mélanges toxiques de toxine et d'antitoxine* deviennent avec le temps *moins toxiques*, ainsi que cela résulte des expériences de *Knorr* (13).

BIBLIOGRAPHIE

(1). A. Wassermann et Takaki. Seitenkettenimmunität. *Berl. klin. Woch.*, 1898, nº 1.

Behring pour Ransom. *Deutsche Med. Woch.*, 1898, nº 5.

(2). Metchnikoff. *Annales de l'Inst. Past.*, t. XII, nºs 2 et 4.

(3). Marie. *Annales de l'Inst. Past.*, t. XI, nº 7, et t. XII, nº 2.

(4). Knorr. *Münchner med. Woch.*, 1898, nºs 11 et 12.

(5). Milchner. *Berl. klin. Woch*, 1898, nº 17.

(6). Ehrlich. *Die Wertbemessung des Diphterieheilserums und deren theoretische Grundlagen.* Iena, Verlag von Gustav. Fischer, 1897.

(7). Roux et Borrel. Tétanos cérébral. *Annales de l'Inst. Past.*, t. XII, nº 4.

(8). Vaillard et Vincent. *Annales de l'Inst. Past.*, 1891, p. 26.

(9). Buchner. *Münch. med. Woch.*, 1893, nºs 24 et 25.

(10). Roux. *Annales de l'Inst. Past.*, 1894, p. 722.

(11). Roger et Josué. *Bull. de la Soc. de Biol.*, 1898, séances du 19 mars et du 19 novembre.

(12). Ehrlich. (6). Zur Theorie der Lysinwirkung. *Berl. klin. Woch.*, 1899, nº 1.

(13). Knorr. *Fortschr. der Med.*, 1897, p. 657.

ÉTUDE CYTOLOGIQUE ET CYCLE ÉVOLUTIF

DE ADELEA OVATA SCHNEIDER

PAR MICHEL SIEDLECKI

Nous avons publié, en 1897 [1], une note, en collaboration avec M. Schaudinn, où nous décrivions très brièvement le cycle évolutif de deux coccidies du *Lithobius forcipatus : Adelea ovata* Schn. et *Coccidium Schneideri* [= (?) *Eimeria Schneideri* Bütschli]. Schaudinn avait particulièrement étudié cette dernière et nous nous étions surtout occupé de *Adelea ovata*. Les circonstances ne nous ont pas permis de publier, sur ces coccidies, un mémoire détaillé en collaboration avec M. Schaudinn, comme nous en avions eu l'intention. Nous ne traiterons donc ici que de l'*Adelea ovata*, laissant à M. Schaudinn le soin de faire connaître l'évolution du *Coccidium Schneideri* et d'une espèce nouvelle du genre *Coccidium*, que l'on rencontre également chez les *Lithobius forcipatus*.

Nous tenons ici à faire remarquer quels avantages nous avons retirés, au point de vue de l'étude de l'*Adelea ovata*, de notre collaboration avec M. Schaudinn, et nous adressons à notre ami de cordiaux remerciements. Nous prions également M. le professeur F.-E. Schulze, qui nous a accueilli dans son laboratoire, de croire à notre vive reconnaissance.

M. F. Mesnil, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, a bien voulu nous aider dans la rédaction et la correction de ce mémoire; il a droit à nos vifs remerciements.

I

PRÉLIMINAIRES

L'espèce qui fait l'objet de ce mémoire a été décrite pour la première fois par Aimé Schneider [2], qui lui a donné son nom; il

1. SCHAUDINN et SIEDLECKI, Beiträge zur Kenntniss der Coccidien. — *Sitz. ber. der d. zool. Gesell.*, 1897.

2. A. SCHNEIDER, *Arch. zool. expér. et génér.*, 1875.

la considérait comme une grégarine monocystidée. Le travail de Bütschli [1], qui a vu quelques stades du développement, et le second mémoire de Schneider [2] ont montré que la vraie place de ce parasite est parmi les coccidies.

Dans notre note, en collaboration avec Schaudinn, de 1897, nous avons fait connaître le cycle évolutif de ce curieux sporozoaire. Nos recherches ultérieures nous ont permis de préciser et de rectifier quelques points de notre première description.

Tout dernièrement, Léger [3] a fait connaître les résultats de ses recherches sur d'autres espèces du genre *Adelea*; les faits qu'il a observés cadrent bien avec ce que nous avons vu chez *A. ovata*.

*
* *

Adelea ovata Schn. se rencontre dans le tube digestif du *Lithobius forcipatus*: on trouve chez le même myriapode (au moins à Berlin, à Cracovie et à Paris) les deux autres coccidies dont nous avons parlé précédemment, et deux grégarines, un *Actinocephalus* et un *Echinocephalus*.

Nous recueillions les animaux sous les pierres ou les vieux morceaux de bois, dans les environs de Berlin, Cracovie et Paris; nous les disséquions généralement aussitôt après leur capture. Pourtant quelques-uns étaient gardés dans des bocaux de verre dans le but de recueillir les excréments avec les kystes qu'ils contiennent.

Les saisons ne nous ont paru jouer aucun rôle sur la fréquence des parasites en général, ni de tel stade en particulier,

En revanche, nous avons noté de grandes différences individuelles; souvent, un *Lithobius* renferme en quantité considérable un stade déterminé d'une coccidie, à l'exclusion presque complète des autres stades de la même coccidie ou des autres sporozoaires.

Nous avons fait nos observations sur des matériaux frais et sur des préparations fixées et colorées (dilacérations et coupes). Les dilacérations étaient faites avec l'intestin entier, enlevé du corps du *Lithobius* avec une pince fine et ouvert suivant sa longueur. Nous renvoyons, pour tout ce qui regarde la

1. O. Bütschli, Uber eine eiförmige Psorospermie aus dem Darm des Lithobius forcipatus. — *Zeitschr. f. wis. Zoologie*, 1881. T. XXXV.
2. A. Schneider, *Tablettes zoologiques*, 1892.
3. Léger, *Bull. du Muséum de Marseille*. T. I, fasc. 1, 1898.

technique, au mémoire que nous avons publié dans ces *Annales* (décembre 1898) sur la coccidie de la seiche.

Il est très facile de distinguer les stades appartenant à l'évolution de l'*Adelea ovata* de ceux qui se rapportent aux deux grégarines et à la coccidie nouvelle que Schaudinn fera connaître. En revanche, il est plus délicat de distinguer certains états d'*A. ovata* et de *C. Schneideri*; mais, avec un peu d'habitude, on arrive à saisir quelques différences tout à fait caractéristiques que nous indiquerons dans le cours de la description qui va suivre.

II

DIMORPHISME DES FORMES INTRACELLULAIRES ET MONONUCLÉAIRES

On trouve, dans les cellules épithéliales de l'intestin du *Lithobius*, de gros individus d'*Adelea ovata* qui sont très reconnaissables. Ce sont des cellules nues, ovoïdes, assez fortement allongées, et renfermant un noyau arrondi avec un gros karyosome (fig. 3).

La forme de ces stades d'*A. ovata* est très caractéristique. L'ellipsoïde est assez régulier; généralement le grand axe est le le double du petit: mais, pour des stades très avancés, la forme est quelquefois plus voisine de la sphère. — Les individus de taille moyenne ont 40 à 50 μ sur 16 à 22 μ; mais nous avons avons observé des individus de 70 μ de long.

Le protoplasme de ces cellules possède une structure alvéolaire; la paroi des alvéoles est formée de fins granules. Les alvéoles sont d'une grandeur assez uniforme; elles sont pourtant un peu plus développées dans la partie périphérique. Jamais nous n'avons noté la présence ni de granules « plastiques » ni de granules « chromatoïdes ». Néanmoins, dans le voisinage du noyau, on remarque un ou plusieurs petits corps de forme irrégulière, prenant assez fortement les couleurs basiques.

Aucune membrane n'entoure ces grosses cellules; ce sont peut-être les alvéoles périphériques qui forment une couche protectrice. D'une façon générale, le protoplasme a une apparence compacte. A l'état frais, il est blanc opaque, légèrement gris, assez réfringent. L'hématoxyline lui donne une teinte bleuâtre qui met en évidence les détails de sa structure; l'éosine et la fuchsine le colorent assez fortement.

La forme et la grosseur de l'*Adelea*, ainsi que l'absence de gros granules dans son protoplasme, permettent de la distinguer facilement du *Coccidium Schneideri*, toujours plus petit, plus sphérique (quoique légèrement piriforme) et présentant dans son protoplasme de nombreux granules de diverses sortes.

Au centre de la cellule d'*Adelea*, se trouve le noyau. D'une forme sphérique, il paraît limité par une membrane. Mais on voit qu'elle est formée de fins granules de chromatine, identiques à ceux de l'intérieur du noyau. Nous sommes donc convaincu que ici, comme chez la *Benedenia* de la seiche, la pseudo-membrane nucléaire ne représente qu'une partie de chromatine plus condensée.

L'intérieur du noyau, observé à l'état frais, semble rempli d'un liquide clair, dans lequel on distingue un gros karyosome et quelques filaments à peine visibles dans son voisinage. Sur des préparations colorées à l'hématoxyline, on voit le noyau rempli d'une masse finement granuleuse, se colorant assez fortement, dans laquelle se trouvent des granules chromatiques semblables à ceux qui composent la membrane nucléaire. Vers le centre du noyau, les granules se condensent et se rangent en filaments; il se constitue ainsi un fin réticulum chromatique (fig. 3). Sa position est toujours très caractéristique; il forme une sorte de capuchon assez lâche au karyosome. Souvent, on voit, en dehors du réticulum, plongés dans le suc nucléaire, quelques débris de chromatine de forme assez irrégulière (fig. 3). Ils ont le même aspect que les corps chromatiques dont nous avons signalé l'existence éventuelle dans le protoplasme. Il nous paraît probable que la chromatine peut sortir du noyau de la coccidie; il existe en effet des stades où le noyau tout entier diffuse dans le cytoplasme. Les corps chromatiques du protoplasme ont donc probablement une origine nucléaire [1].

Au voisinage du réseau chromatique, dans le centre du noyau, se trouve un gros karyosome. C'est une sphère très réfringente et de structure compacte. Quelquefois, on distingue de petites vacuoles claires à son intérieur, mais le plus généra-

1. Nous sommes convaincu que les prétendus centrosomes que Labbé signale chez plusieurs coccidies (*Archiv. zool. expérim.*, 1896) correspondent simplement aux corpuscules chromatiques décrits ici. Jamais nous n'avons vu, chez les diverses coccidies que nous avons étudiées, de vrais centrosomes, et nous sommes persuadé qu'ils n'existent pas. Les schémas de la structure de ces êtres que l'on trouve dans le *Traité de zoologie concrète* de Delage et Hérouard sont donc très éloignés de la réalité.

lement, l'aspect est uniforme. Ce karyosome prend fortement à la fois les colorants basiques et les colorants acides. Ils est probable qu'il est formé de deux substances intimement mélangées, l'une basophile, l'autre acidophile. Chez *Benedenia octopiana*, la présence de ces deux substances est certaine; elles sont séparées; l'une forme la couche corticale, l'autre la masse centrale du karyosome. Telle est la structure d'une *Adelea ovata* femelle de grande taille. Les stades qui y conduisent sont figurés en 1 et 2. (V. les Pl. I à III.) Ce sont des cellules très allongées, avec un protoplasme nettement alvéolaire et un gros noyau avec un karyosome. Autour du noyau, le protoplasme est particulièrement condensé et finement granuleux.

Le parasite semble être constitué de trois parties : deux alvéolaires occupant les deux bouts et une granuleuse au milieu renfermant le noyau à son intérieur. Celui-ci est relativement très développé et son diamètre atteint presque la largeur de la coccidie; il possède une membrane bien nette; son réseau chromatique n'est pas très condensé; il consiste en petits bâtonnets et en filaments répandus dans toute la masse; son karyosome prend fortement les colorants et présente quelques vacuoles à son intérieur.

Pendant l'accroissement du parasite, la masse cytoplasmique granuleuse centrale se répartit dans tout le reste de la cellule et il n'existe plus de zone différenciée autour du noyau. Celui-ci croît moins vite que le protoplasme, ce qui fait que dans la cellule adulte (fig. 3), il n'occupe plus que la moitié de sa largeur.

Chez les jeunes cellules, on observe la présence, dans les espaces intervacuolaires, de granules « chromatoïdes » (au sens de Thélohan); jamais nous n'avons noté de granules plastiques qui sont, au contraire, très communs chez *Coccidium Schneideri*, à la période d'accroissement.

*
* *

A côté des grandes *Adelea ovata* (fig. 3), on trouve des individus de plus petite taille, ne dépassant pas 40 μ de diamètre maximum, qui ont néanmoins tous les caractères d'adultes (fig. 13), et qui se distinguent facilement aussi bien des formes d'*Adelea* que nous venons de décrire que des autres coccidies du *Lithobius*.

La forme est ovale : le protoplasme, finement granuleux, ne montre des vacuoles qu'aux deux extrémités. Vers l'une d'elles, il y a toujours quelques petites masses colorées en brun, qui ont l'aspect de pigment. Le noyau est relativement très gros ; la membrane est fortement marquée, le réseau chromatique est composé de bâtonnets et de granules. Vers le centre du noyau, le réseau est un peu plus condensé et on observe un gros karyosome présentant quelques vacuoles. La structure granuleuse du protoplasme, la grosseur du noyau, et surtout la présence du pigment donnent un aspect très caractéristique à ces formes et les distinguent des autres coccidies. — Leur développement permet de les caractériser encore plus nettement.

Les états les plus jeunes (fig. 11) se présentent comme des corpuscules allongés, légèrement arqués, un peu plus gros à une extrémité qu'à l'autre ; leur protoplasme, très finement granuleux, renferme quelques vacuoles et des masses brunes *p* à l'un des pôles. Le noyau, de forme ovale, est d'une structure très compacte, il est entièrement rempli d'une masse granuleuse se colorant fortement et laissant à peine apercevoir quelques traces de chromatine. Le karyosome a une position bien caractéristique : il est *périphérique ;* généralement, il est aplati, peut-être par suite de la pression du suc nucléaire. Autour du noyau, on aperçoit une petite auréole claire.

A mesure que la coccidie croît, les vacuoles protoplasmiques augmentent de nombre, surtout aux deux pôles ; le noyau s'arrondit (fig. 12) et, dans son intérieur, la masse chromatique devient moins compacte. Le karyosome s'arrondit aussi et se porte vers le centre du noyau ; il montre quelques vacuoles. Enfin, on arrive au stade de la fig. 13 que nous avons décrit.

*
* *

Les deux formes d'*Adelea ovata* que nous venons de signaler (fig. 8 et 13) peuvent rester dans les cellules intestinales du *Lithobius* assez longtemps sans changer de forme ni de structure ; elles ne s'accroissent plus, n'assimilent plus, leur protoplasme perd ses gros granules, sauf toutefois le pigment. Nous les considérons à cet état comme *adultes*, par comparaison avec celles que nous avons décrites chez *Benedenia octopiana*.

Il y a ici un *dimorphisme*, puisque nous avons deux séries de formes, différentes à leur état final et aussi dès le début de leur

évolution. Le rôle de ces deux formes est également différent. Les grosses peuvent être comparées aux cellules génitales femelles des métazoaires, les petites au contraire donnent les produits mâles. Il y a donc, chez *Adelea ovata*, un véritable *dimorphisme sexuel*.

III

FORMATION DES MACROGAMÈTES (fig. 4-10)

Considérons les grosses formes, celles que nous avons assimilées à des cellules génitales femelles, et observons leur multiplication. Ce processus commence par des changements dans la structure nucléaire. Le karyosome, par une sorte de bourgeonnement, se transforme en deux sphères plus ou moins égales (fig. 4); les karyosomes secondaires bourgeonnent à leur tour et les produits de cette tranformation se placent à la périphérie du noyau. En même temps, le réseau chromatique se désagrège; il n'est plus localisé autour du karyosome; on trouve des bâtonnets disséminés dans toute la vésicule nucléaire (fig. 4). Les karyosomes les plus petits renforcent le réseau. La membrane nucléaire devient de plus en plus mince et enfin disparaît. Alors les petits karyosomes se portent à la périphérie de la coccidie (fig. 5) et ils sont suivis par les bâtonnets et les granules chromatiques; le tout chemine dans les espaces intervacuolaires (fig. 6). Au centre de la cellule, il ne reste plus qu'une masse irrégulière, granuleuse, chromatique, qui, elle aussi, se porte finalement à la surface.

Pendant que ces phénomènes s'accomplissent, la coccidie s'arrondit et son protoplasme se condense, les alvéoles deviennent plus petites. Les karyosomes de la surface sont bientôt entourés de bâtonnets et de granules chromatiques, il se forme ainsi un certain nombre d'amas chromatiques, d'abord de volumes inégaux, qui s'égalisent par le moyen de divisions directes. La périphérie de la coccidie est alors parsemée de petits noyaux étoilés à structure assez lâche, où l'on ne reconnaît même plus les karyosomes primitifs (fig. 7).

Ce stade est tout à fait caractéristique d'*Adelea ovata* : la grosseur de la cellule, la netteté des étoiles chromatiques, l'absence de karyosomes, la fine structure du protoplasme,

empêchent de le confondre avec un stade semblable de *Coccidium Schneideri*.

Autour de chaque noyau, se différencie une zone plus claire de protoplasme (fig. 7) qui s'étend de plus en plus, et finalement deux zones voisines ne sont plus séparées que par une mince bande de cytoplasme plus grossièrement granuleux et prenant plus fortement l'hématoxyline [1].

Les nouveaux noyaux se condensent de plus en plus et prennent une forme ovale ; leur réseau chromatique est très bien marqué et très caractéristique ; il consiste en bâtonnets relativement très épais qui forment aussi la membrane nucléaire un peu irrégulière (fig. 8). Les zones claires protoplasmiques commencent à faire saillie à la surface de la coccidie, elles ont bientôt la forme de bandes allongées un peu plus larges dans la partie externe et légèrement courbées (fig. 9). Tous ces corps restent attachés à la surface d'une petite sphère granuleuse centrale, reliquat de différenciation. Finalement, ils s'en détachent. A ce stade (fig. 10) les macrogamètes sont mûrs. Ils ont la forme d'un mince croissant de 20 à 25 μ sur une largeur de 4 μ, avec les deux extrémités atténuées. Le milieu du croissant est occupé par un noyau *sans karyosome*. Le protoplasme est très finement granuleux et on n'y distingue pas d'alvéoles. A ces caractères, on distingue facilement les stades endogènes d'*Adelea ovata* de ceux de *Coccidium Schneideri ;* les croissants de ce dernier ont des karyosomes très nets, le corps est plus court et le protoplasme plus dense.

La disposition des *macrogamètes* mûrs est variable ; elle dépend de la position des noyaux à la surface de la coccidie pendant leur formation. Si les noyaux ont, comme dans la fig. 7, une disposition périphérique régulière, les macrogamètes seront disposés en rosette ou en marguerite comme dans la fig. 9. Mais souvent, les noyaux sont localisés dans une ou deux régions du corps de la coccidie (fig. 8) et alors les macrogamètes forment un amas irrégulier (fig. 10) dont le petit reliquat de différenciation occupe un pôle.

Le nombre des macrogamètes est variable; il est généralement d'une vingtaine, mais il peut atteindre 40. Les fig. 9 et 10, pour la clarté, ne représentent qu'une partie du stade à macrogamètes.

1. La fig. 4 de notre note préliminaire schématise le stade.

Observés à l'état vivant, ces éléments sont assez faciles à reconnaître à cause de l'absence de karyosome. Le protoplasme est clair et transparent. Quand ils se meuvent, on voit à la surface une striation longitudinale, mais elle n'est pas reconnaissable à l'état de repos, ni sur les préparations colorées. Nous pensons qu'elle est due à un arrangement particulier des granules protoplasmiques qui ne se produit qu'au moment des mouvements et qui en est peut-être une conséquence.

Un macrogamète peut se courber si fortement que ses deux extrémités se croisent ; il se distend ensuite rapidement. — Il peut aussi ramper lentement à l'intérieur de l'intestin du *Lithobius*. Sa mobilité lui permet de pénétrer dans l'épithélium intestinal ; il fait une petite ouverture dans la paroi de la cellule. Il se place près du noyau de cette cellule, se raccourcit et s'arrondit ; son noyau perd sa forme ovale et sa structure, de compacte, devient lâche. En même temps, apparaissent quelques vacuoles au milieu du protoplasme granuleux et un karyosome s'individualise dans le noyau. Nous arrivons ainsi à une forme jeune telle que celle figurée en 1, et nous avons vu comment elle pouvait évoluer en une forme adulte.

Nous avons donc un cycle évolutif fermé. Une cellule donne, par suite d'une division, d'abord nucléaire, puis cytoplasmique, naissance à plusieurs germes qui deviennent libres, pénètrent dans de nouvelles cellules hôtes et y évoluent en des individus semblables à la cellule-mère. L'auto-infection d'*Adelea ovata* se trouve ainsi réalisée. — Mais, certaines formes adultes, au lieu de se diviser dans les cellules intestinales, tombent dans la lumière du tube digestif, et là sont fécondées : d'où le nom de *macrogamètes* que nous donnons à ces éléments.

La division nucléaire, qui aboutit à la formation des macrogamètes, est identique à celle que nous avons décrite chez *Benedenia octopiana* et qui précède la formation des microgamètes. Nous l'avons appelée *division multiple* et l'avons comparée à celle que Schaudinn a fait connaître chez les Foraminifères, en insistant sur cette différence principale que, chez les coccidies, les karyosomes jouent un rôle spécial : ils paraissent être les centres d'attraction pour la chromatine à la périphérie de la cellule.

Les observations que nous avons faites prouvent qu'à aucun

moment la cellule qui donne les macrogamètes n'est entourée d'une membrane. Il faut donc proscrire rigoureusement les termes de « *kystes* eimériens », ou bien « *kystes* à macro et à microgamètes » qu'emploient un certain nombre d'auteurs ; — nous sommes, sur ce point, en complet accord avec Schuberg et Simond.

Ce cycle à macrogamètes d'*Adelea ovata*, que nous venons de décrire, a-t-il été vu par d'autres auteurs ? Avant nous, la seule forme endogène décrite chez le *Lithobius forcipatus* était celle nommée par Bütschli, *Eimeria Schneideri*. — Doit-on la rapporter à *Adelea ovata* ou à l'un des deux *Coccidium* ? Schuberg et Léger pensent, *a priori*, que c'est le stade « eimérien » d'*Adelea*. — A la vérité, il nous semble impossible de trancher la question, d'intérêt secondaire d'ailleurs ; les détails donnés par Schneider et Bütschli n'étant caractéristiques ni de la forme à macrogamètes d'*Adelea*, ni de celles des *Coccidium*.

IV

FORMATION DES MICROGAMÉTOCYTES (fig. 13-17).

Examinons maintenant l'évolution des *Adelea ovata* de petite taille, telles que celles de la fig. 13. Elles donnent aussi naissanée à des corps en croissant; mais la structure et le rôle de ces éléments sont très différents de ceux des macrogamètes que nous venons de décrire.

Les premiers changements consistent dans la division du karyosome ; il donne, par bourgeonnement, naissance à des karyosomes secondaires. Puis la membrane du noyau s'évanouit : en même temps, le réticulum chromatique se transforme en amas de bâtonnets et de filaments qui se groupent autour des nouveaux karyosomes. On a alors, au milieu de la coccidie, quelques amas chromatiques, tous avec un karyosome central. Ces amas se divisent, par le processus direct (fig. 14) et nous arrivons à un stade où l'on voit des noyaux à structure assez lâche, de volumes égaux, avec karyosomes, occupant la zone équatoriale de la coccidie (fig. 15) et laissant libres ses deux pôles. Le nombre des nouveaux noyaux est de 8 à 12 ; exceptionnellement, nous en avons observé 14 ; mais le nombre

régulier est 12. — Ils ne sont pas tous à la surface de la coccidie ; quelques-uns restent dans la profondeur.

Le protoplasme se divise à son tour, et l'on voit bientôt un certain nombre de sillons méridiens à la surface de la cellule, qui se trouve ainsi divisée en autant de parties qu'il y avait de noyaux. Toutes ces portions sont disposées comme les quartiers d'une orange. Les noyaux situés dans la profondeur de la coccidie s'entourent aussi d'une portion différenciée de protoplasme. On le reconnaît très nettement dans une coupe équatoriale du parasite (fig. 16). — Les sillons, en s'approfondissant, provoquent la séparation complète des nouveaux corps. On a ainsi constitué un barillet extrêmement régulier, composé de germes en forme de croissants (fig. 17).

Chaque croissant est un peu atténué vers les deux extrémités. Son protoplasme a une structure plutôt alvéolaire qu'uniformément granuleuse. Son noyau est devenu très compact : il laisse à peine reconnaître un réseau chromatique et surtout un karyosome, parfois divisé en 2 ou 3 fragments, toujours périphérique. Autour du noyau, on voit toujours une zone claire (même sur les croissants vivants). D'un côté seulement du noyau, on distingue de petits granules bruns pigmentaires provenant des granules des stades précédents (*p*, fig. 17).

Au centre du barillet, on ne trouve pas de reliquat de différenciation : exceptionnellement, on observe un tout petit amas granuleux vers un pôle.

La cellule hôte, en se rompant, laisse échapper les croissants qui se trouvent alors dans la lumière du tube digestif. On les rencontre parfois disséminés dans le contenu intestinal en nombre considérable.

Ils ont une assez grande mobilité et leurs mouvements rappellent ceux des macrogamètes. Nous n'avons pas observé nettement, sur le frais, la pénétration de ces croissants dans les cellules intestinales et nous avons même, dans notre note préliminaire, émis l'idée que ces éléments étaient incapables d'infecter une cellule épithéliale et de s'y transformer en formes adultes. Mais, si nous comparons les croissants, encore accolés en barillet (fig. 17), avec certaines formes jeunes d'*Adelea* telles que celles de la fig. 11, nous sommes frappé de la grande ressemblance : protoplasme avec pigment brun d'un côté seule-

ment du corps, noyau à structure compacte et karyosome périphérique. — Nous pensons donc que les cellules de la fig. 11 peuvent dériver des croissants de la fig. 17. — Nous avons donc là encore un nouveau cycle évolutif d'*Adelea* complètement fermé et un nouveau système d'autoinfection, puisque nous avons prouvé que les formes de la fig. 11 donnent les barillets de la fig. 17.

Mais ces croissants peuvent évoluer d'une autre façon. Nous verrons qu'il *s'accolent sur les formes femelles (macrogamètes mûrs) et là donnent naissance à 4 éléments virgulaires capables de féconder les cellules femelles, par conséquent homologues à des spermatozoïdes.* Nous appellerons ces derniers éléments MICROGAMÈTES, comme chez les autres coccidies, et par suite, d'accord avec MM. Mesnil et Laveran, nous donnerons aux croissants de la fig. 17 le nom de MICROGAMÉTOCYTES, puisqu'ils sont homologues des *spermatocytes* de premier ordre [1].

Le stade à microgamétocytes d'*Adelea ovata* a-t-il été vu avant nous ? Comme pour celui à macrogamètes, il nous est impossible de répondre à la question, les descriptions de nos prédécesseurs étant insuffisantes.

Léger [2], depuis la publication de notre note de 1897, a fait connaître des stades analogues chez les deux autres espèces du g. *Adelea* : *A. dimidiata* Schn. et *A. tipulae*, Léger. — La forme des croissants de cette dernière espèce et leur rôle prouve manifestement que ce sont des microgamétocytes, bien que Léger n'indique pas de différence entre les formes adultes qui les donnent et celles qui produisent les macrogamètes. Enfin, tout récemment, Laveran [3] vient de faire connaître l'existence d'un *stade à microgamétocytes* chez la *Klossia helicina*.

V

PHÉNOMÈNES SEXUÉS

Comme chez toutes les autres coccidies, étudiées avec soin à ce point de vue, la formation des kystes résistants, chez *Adelea ovata*, est précédée de phénomènes sexués. — Ils se passent toujours dans la lumière du tube digestif.

1. C'est par erreur que, dans notre note préliminaire, nous avons appelé microgamètes, les éléments des barillets.
2. LÉGER, *L. c.*
3. LAVERAN, *C. R. Soc. Biologie*, séance du 26 novembre 1898.

Le commencement de ce processus est très facile à reconnaître. Un *microgamétocyte* vient s'accoler à une région quelconque de la surface d'un individu adulte de grande taille (*provenant d'un macrogamète*) (fig. 18); bientôt après, il occupe un des pôles. Ce stade de début est tout à fait caractéristique.

Bientôt, des changements apparaissent dans les deux individus accolés; les caractères sexués des deux gamètes s'accentuent de plus en plus.

1° *Formation des quatre microgamètes* (fig. 18-26). — Le noyau du microgamétocyte qui, au début (fig. 18), était d'une structure compacte, avec un karyosome périphérique, devient plus lâche, et son réseau chromatique se transforme en un amas de bâtonnets et de filaments; son karyosome renforce le réseau et n'est plus visible (fig. 19). En même temps, le corps entier du *microgamétocyte* prend une forme plus arrondie et s'accole plus fortement au macrogamète; leurs protoplasmes semblent être en contact intime.

A ce stade, le noyau du microgamétocyte a quelque ressemblance avec un stade de peloton lâche chez les cellules en division mitotique. Peu à peu, la chromatine se divise en deux portions égales; les bâtonnets nucléaires se placent aux deux côtes opposés du corps protoplasmique et ne restent unis que par de minces filaments (fig. 20-21.) Ce stade rappelle beaucoup le *diaster*, dans la division karyokinétique, d'autant plus qu'entre les deux portions du noyau existe un espace clair ressemblant un peu à un fuseau central.

Tandis que les deux moitiés chromatiques s'éloignent de plus en plus, on voit, au milieu de la partie claire, un petit corpuscule chromatique (fig. 21) qui correspond sans doute au *corpuscule intermédiaire* (Zwischenkorper) décrit par Flemming et Kostanecki chez des Métazoaires, et surtout par Hertwig, Balbiani, Eismond, etc., chez des Protozoaires.

Finalement nous arrivons à un stade où le microgamétocyte renferme deux noyaux avec une structure de peloton lâche (fig. 22.)

A partir de ce moment, les changements nucléaires ont sans doute lieu très vite, car on les observe rarement dans les préparations. *Les deux noyaux se divisent, sans se condenser au préalable et sans avoir repris leur forme régulière, par simple étranglement*,

chacun en deux fractions égales (fig. 23); l'axe de ces nouvelles divisions est perpendiculaire à celui de la première.

Chacun des nouveaux noyaux se porte à la surface de la cellule, et nous avons alors quatre petits amas superficiels de chromatine, plus ou moins régulièrement disposés, autour desquels se forment bientôt des espaces clairs (fig. 24.) La chromatine de ces petits noyaux se condense de plus en plus et prend la forme de masses compactes un peu allongées (fig. 25), qui s'étirent de plus en plus. A l'état frais, elles se présentent comme de petites virgules très réfringentes, mobiles à la surface du protoplasme du microgamétocyte. Elles restent ainsi attachées un certain temps; finalement elles se détachent, mais ne quittent pas le voisinage immédiat du macrogamète.

Ces corps allongés, *sans cils*, formés à la surface du microgamétocyte, sont les véritables éléments mâles, les *microgamètes*.

Chez les genres *Coccidium* et *Klossia*, les *microgamètes* se forment directement à la surface d'une coccidie adulte, *en un temps*. Ici la formation a lieu *en deux temps :*

1° Division d'une Coccidie adulte en un nombre de croissants, généralement égal à 12, sans reliquat de différenciation :

2° Formation de 4 microgamètes à la surface d'un croissant, presque tout le cytoplasme constituant un reliquat.

Une remarque d'ordre physiologique doit aussi être faite; les microgamétocytes sont doués évidemment d'une chimiotaxie particulière vis-à-vis des macrogamètes mûrs, puisqu'on les trouve accolés à leur surface. — Or généralement, chez les êtres vivants, ce pouvoir chimiotactique n'est dévolu qu'aux éléments mâles tout à fait mûrs. Ici, il appartient aux *grands-parents des microgamètes* : c'est un cas particulier extrêmement curieux.

Laveran, chez *Klossia helicina*, a observé également que les microgamétocytes pénètrent dans la cellule rénale qui contient un macrogamète adulte, et là donnent naissance à 4 microgamètes. Il a souvent vu plusieurs microgamétocytes autour d'un élément femelle. — Chez *Adelea ovata*, il n'y en a qu'un accolé au macrogamète. Nous n'avons noté qu'une seule excep-

tion; dans ce cas, il y avait deux microgamétocytes au contact du macrogamète.

2° *Maturation de l'élément femelle* (fig. 18-26). — Tandis que le microgamétocyte produit les microgamètes, le macrogamète présente des changements très importants qui le rendent apte à être fécondé.

Dès que le microgamétocyte occupe un des pôles du macrogamète, le noyau de ce dernier quitte sa position centrale et se porte à une extrémité de la cellule, soit celle où se trouve le microgamétocyte, soit l'autre.

Le réseau chromatique nucléaire, qui était concentré autour du karyosome (fig. 19), se répartit dans tout l'intérieur du noyau (fig. 22) sous forme de petits bâtonnets et filaments. Le karyosome semble se gonfler un peu et donne quelques petits bourgeons qui viennent renforcer le réseau chromatique, en se dissolvant dans le suc nucléaire. Une partie du réseau se dissout aussi et par suite l'intérieur du noyau se remplit d'une matière granuleuse dans laquelle on distingue difficilement quelques débris de chromatine (fig. 20).

A ce moment, le noyau est tout près de la surface de la coccidie; sa paroi devient très mince et disparaît même dans la partie la plus voisine de la périphérie. Par cette voie, *une partie de la chromatine nucléaire s'échappe à la surface de la coccidie.*

Au début, ce sont les débris les plus gros qui quittent le noyau (fig. 18 *e*); mais ensuite, une partie du contenu granuleux s'échappe aussi (fig. 23).

Après avoir ainsi perdu une partie de sa chromatine, le noyau s'éloigne un peu de la périphérie de la coccidie[1]; son contour redevient net. La chromatine expulsée dégénère à la surface de la coccidie où on peut la reconnaître sous forme de masse irrégulière se colorant assez fortement (fig. 21 *e*).

Dans le noyau, réduit à une partie de sa chromatine, le karyosome qui était auparavant très gonflé (fig. 18-23), commence à diminuer de volume, et nous pensons qu'une partie de sa chromatine sert à constituer le réseau nucléaire nouveau qui apparaît formé de filaments granuleux (fig. 24); le suc nucléaire devient aussi plus clair et sa chromatine doit se condenser éga-

1. Le noyau peut rester au pôle de la coccidie où l'expulsion de chromatine a eu lieu, ou se porter vers l'extrémité où est accolé le microgamétocyte.

lement sur le réseau (fig. 25.) Finalement, au centre du noyau femelle, on observe un réseau compact avec quelques petits karyosomes, provenant évidemment de la division de ce qui restait du karyosome primitif (fig. 26). Le reste du noyau est très clair, et on aperçoit seulement quelques filaments chromatiques qui le traversent.

A ce stade, le noyau femelle est tout près de la surface de la coccidie, et il est apte à être fécondé par les microgamètes également mûrs (fig. 26)[1].

Ce phénomène d'expulsion d'une partie de la chromatine femelle doit-il être considéré comme une *réduction* ou comme une *épuration* nucléaire ? En présence de ces faits que le karyosome, qui renferme une quantité considérable de chromatine, n'en abandonne aucune trace, et sert ensuite à la reconstitution du réseau chromatique, nous pensons que l'on a affaire à une *épuration nucléaire*. Les parties nucléaires qui vont servir à la reproduction, condensées en partie dans le karyosome, restent, et le réseau, dont la chromatine jouait probablement un rôle dans l'alimentation et l'assimilation de la cellule coccidienne, est en grande partie rejeté.

3. *Fécondation* (fig. 27-31). — Tous ces phénomènes accomplis, nous avons donc, en présence, un macrogamète qui a subi une épuration nucléaire, et *quatre* microgamètes à la surface de leur reliquat de différenciation.

Nous avons dit, qu'à ce stade, le noyau femelle se trouve toujours à l'un des pôles de la cellule, tout près de la périphérie. Tantôt, c'est le pôle où le microgamétocyte est accolé (fig. 26) ; tantôt, c'est le pôle opposé (fig. 25). Dans le premier cas, la pénétration d'un microgamète à son intérieur n'offre aucune difficulté. — Dans l'autre cas, les quatre microgamètes quittent leur reliquat, et grâce à leurs mouvements, ils se portent à l'autre pôle du macrogamète. Mais jamais, ils ne quittent le voisinage immédiat de la cellule femelle.

Un microgamète pénètre alors dans le noyau femelle, et aussitôt, il se présente sous forme d'un amas de chromatine (fig. 27). Le réseau femelle commence, en même temps, à se transformer

1. Les divers stades de maturation du macrogamète et de production des microgamètes, sont loin de se correspondre deux à deux. Nos figures 18 à 26 rangées pour suivre le second phénomène, ne le sont pas pour le premier.

en filaments très longs qui se rapprochent lentement du réseau mâle et entrent finalement en contact avec lui. La membrane nucléaire, du côté opposé à celui par où a pénétré le microgamète, devient plus mince, et le noyau s'étire en forme de queue de comète de manière à atteindre l'autre pôle de la cellule (fig. 27).

Les trois microgamètes, qui n'ont pas pénétré, restent au voisinage de la surface de l'élément femelle et dégénèrent comme le reliquat plasmique dans lequel se montrent de nombreux grains de pigment. Souvent, on voit (fig. 27, 30, 31, 39) le reliquat d'un côté et les trois microgamètes dégénérés de l'autre côté du macrogamète. Cette disposition correspond au cas où le noyau femelle est venu toucher la surface au pôle opposé au microgamétocyte.

Le réseau chromatique mâle entre peu à peu en contact intime avec le réseau femelle. Leur ensemble devient un faisceau de fibrilles chromatiques qui traversent la cellule de part en part, plus ou moins parallèlement à sa longueur. Pourtant, à la place où était précédemment l'amas mâle, le peloton de filaments chromatiques est un peu plus serré (fig. 28); à l'autre extrémité du noyau, on voit un filament tordu. Finalement les deux chromatines mâle et femelle se confondent complètement (fig. 29) et le noyau commence à abandonner la surface de la coccidie et à se concentrer vers le centre.

La chromatine se condense vers le milieu de la cellule et les deux pointes du fuseau nucléaire se contractent (fig. 30). Enfin, nous avons, au centre de la coccidie, un noyau de forme un peu irrégulière, avec un fin réseau chromatique (fig. 31).

Pendant que tous ces phénomènes s'accomplissent, les limites du noyau, soit quand il a la forme d'un fuseau (fig. 27-29), soit quand il est contracté (fig. 30-31), sont assez nettes. Il n'y a pourtant pas de membrane nucléaire; mais la chromatine est plongée dans une sorte de liquide qui se colore moins que le protoplasme environnant, ce qui donne l'illusion d'une enveloppe au noyau.

Les processus sexués sont maintenant terminés : l'union des deux gamètes est complète.

* * *

Les phénomènes que nous venons de décrire ont été vus en

partie par A. Schneider. Dans son mémoire de 1875, il dessine des stades qui correspondent sans aucun doute à nos figures 18 et suivantes, et il s'exprime ainsi : « Quelques individus présentent un petit corps allongé adhérant à la paroi, ainsi que cela est représenté (fig. 2, 3 et 4) par la lettre *a*... La signification de ce fait m'échappe entièrement ». — Nous ne nous expliquons pas comment un aussi bon observateur que Schneider n'a pas soupçonné un acte sexué; car, dans son mémoire de 1892, il représente (fig. 3 et 6) des stades avec noyau en forme de fuseau allongé, et il remarque très justement qu'ils précèdent la formation des spores.

Léger (*l. c.*) a vu des stades semblables chez *Adelea tipulae* et leur attribue la même signification que nous. Enfin, Laveran (*l. c.*) vient de découvrir, chez *Klossia helicina*, des phénomènes sexués tout à fait semblables à ceux d'*Adelea*. Sur ses préparations colorées[1], il a vu des figures (qu'il a eu l'amabilité de nous montrer) qui rappellent tout à fait celles que nous avons signalées brièvement en 1897, avec Schaudinn, et que nous venons de décrire en détail.

*
* *

Nous avons dit que les deux divisions nucléaires qui aboutissent à la formation des quatre microgamètes aux dépens du microgamétocyte se passaient d'une façon très différente. — La première est très régulière et ressemble à une karyokinèse. La seconde consiste simplement en une disposition de la chromatine en deux moitiés correspondant chacune à un microgamète. Nous pensons que la première division réduit la *quantité* de chromatine, dans chaque noyau, de moitié; — la seconde se présente comme un phénomène de réduction du *nombre* des chromosomes. *Un microgamète serait donc une cellule réduite et comme quantité de chromatine et comme nombre de chromosomes.* — La ressemblance avec un spermatozoïde de métazoaire est donc tout à fait frappante.

La pénétration d'*un* seul microgamète est conforme à la loi générale; et, dans le cas d'*Adelea*, nous sommes sûr qu'il n'y a pas polyspermie, puisque nous retrouvons les 3 autres micro-

1. Léger n'a observé qu'à l'état frais les phénomènes de copulation chez *Adelea tipulæ*.

gamètes au voisinage du macrogamète fécondé. Cette polyspermie serait pourtant plus facile que chez les autres coccidies, car la pénétration du microgamète ne détermine pas la formation d'une membrane autour de l'élément femelle.

Nous pensons avoir observé un cas seulement où il y avait eu pénétration de deux microgamètes: il y avait un double fuseau chromatique dans une *Adelea ovata*; mais la cellule ne semblait pas être normale.

* * *

La copulation, chez *Adelea ovata*, est *hétérogamique* au même degré que chez les autres coccidies dont nous avons fait connaître l'évolution. Léger[1] a donc tort de dire que les *Adelea* sont intermédiaires, au point de vue des processus sexués, entre les *Coccidium* et les Grégarines où on admet qu'il y a *isogamie* (sans l'avoir prouvé, à notre avis).

VI

FORMATION DES SPOROCYSTES (FIG. 32-40).

Nous avons laissé le macrogamète fécondé au stade où le noyau est concentré au centre de la coccidie (fig. 31). Il ne reste pas longtemps dans cette position : il se porte bientôt à la surface; ses limites disparaissent : son réseau chromatique chemine parmi les granules et les vacuoles cytoplasmiques. La structure du cytoplasme est d'ailleurs plus condensée, et, particulièrement au centre, les vacuoles sont rares (fig. 32).

Cette condensation augmente même encore et, aux stades suivants, il n'y a plus trace d'alvéoles; autour du réseau nucléaire, on voit encore une zone claire.

Arrivé à la surface, le noyau se désagrège en un amas de courts bâtonnets irréguliers (fig. 33) qui se groupent dans la partie la plus claire du protoplasme en une plaque irrégulière. Lentement, la chromatine de cette plaque s'étire : il se fait un étranglement au milieu, et l'on a deux noyaux reliés par un mince filament chromatique au milieu duquel on aperçoit un

1. Léger, *Arch. zool. expérim. et générale*. Notes et Revue, 1898.

« corpuscule intermédiaire » qui, lui-même, se divise en deux: chacune de ses moitiés z est en relation avec l'un des nouveaux noyaux (fig. 34).

Ces noyaux se divisent à leur tour, par le même processus. La figure 35 montre de nombreux stades de division nucléaire. Finalement, on a, à la surface de l'*Adelea*, un assez grand nombre de noyaux.

Leur réseau se présente toujours avec la plus grande netteté; il n'est jamais entouré d'espace clair. Ces caractères permettent de distinguer facilement ce stade de celui de la fig. 7 (formation des macrogamètes).

Peu à peu, autour de chaque noyau, se limite une portion cytoplasmique dont il occupe le centre (fig. 36). Dans ces zones, le protoplasme commence à devenir alvéolaire, tandis que les régions intermédiaires restent granuleuses. — Il apparaît de petits granules réfringents *g*, bien visibles à l'état frais (fig. 37) qui, lentement, se fusionnent et donnent une grosse sphère *s* incolorable à l'hématoxyline (fig. 38).

En même temps, les régions protoplasmiques qui entourent les noyaux, s'individualisent de plus en plus, s'arrondissent, et on a finalement de petites sphères qui prennent une membrane.

Le centre de ces sphères qui sont les futurs sporocystes, ou les sporoblastes, est occupé par la grosse boule réfringente; le noyau est situé latéralement.

L'ensemble des sporocystes constitue un amas irrégulier, et, à côté, on peut encore apercevoir les restes du microgamétocyste et des 3 microgamètes (fig. 39). Dans chaque sporocyste, le noyau se divise en deux par une sorte de karyokinèse (fig. 39); et, dans un amas, on trouve tous les noyaux au même stade.

Le protoplasme de chaque sporocyste se condense et se divise en deux parties qui prennent une forme de bâtonnets allongés et courbés. Les deux noyaux occupent d'abord deux extrémités, de même pôle, des bâtonnets qui entourent la grosse boule réfringente, représentant probablement le reliquat sporal (fig. 40). — Cette boule a un aspect échinulé et, à son intérieur, on voit toujours un petit corpuscule rond, colorable à l'hématoxyline.

Le dernier changement, dans les sporocystes, consiste en ce que les noyaux occupent le centre des sporozoïtes.

Quand un sporocyste arrive dans la lumière du tube digestif d'un *Lithobius*, il éclate et il s'ouvre à la façon d'une coquille de lamellibranche ; les sporozoïtes, mis en liberté, peuvent pénétrer dans les cellules épithéliales de l'intestin et provoquer l'infection. A quelles sortes d'individus donnent-ils naissance? Il nous est impossible de donner une réponse précise. — Il nous paraît pourtant peu probable que les sporozoïtes soient déjà différenciés en mâles et femelles. Nous pensons qu'ils peuvent produire indifféremment des individus mâles ou des femelles.

VI

CYCLE ÉVOLUTIF D'ADELEA OVATA ET CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES COCCIDIES.

D'après ce que nous avons vu, le cycle évolutif d'*Adelea ovata* est le suivant. Les sporozoïtes des sporocystes se développent, dans les cellules épithéliales de l'intestin du *Lithobius*, les uns en individus mâles, les autres en individus femelles. Ces formes, arrivées à l'état adulte, se reproduisent par multiplication nucléaire, suivie de division cellulaire. On peut avoir ainsi un certain nombre de générations de formes mâles et de formes femelles, produisant l'autoinfection. Mais, à un moment donné, une forme femelle (macrogamète adulte), tombe dans la lumière du tube digestif ; une jeune forme mâle (microgamétocyte) s'y accole, produit 4 microgamètes ; l'un d'eux féconde le macrogamète qui donne alors naissance à un certain nombre de sporocystes, chacun avec deux sporozoïtes. Ces sporocystes peuvent résister dans le milieu extérieur et servir à transporter l'infection chez un autre *Lithobius*.

La théorie de R. Pfeiffer, qui a montré que les coccidies ont deux cycles évolutifs, l'un endogène, l'autre exogène, est donc applicable à *Adelea ovata*. Nous y avons ajouté un fait nouveau ; nous avons montré en effet (en même temps que Schaudinn et nous, Simond exprimait la même idée) que *la production des germes durables est précédé d'un phénomène sexué*. — Il nous est impossible de prouver d'une façon matérielle qu'il n'y a jamais de coccidies donnant des sporocystes, sans avoir été fécondées ; mais nous sommes convaincu que la copulation est *nécessaire* à la formation des germes résistants.

Simond, parlant des formes endogènes des coccidies, déclare (ces *Annales*, 1897, p. 574) que les coccidies « possèdent ainsi un moyen de multiplication rapide, en rapport avec des conditions de vitalité propre et de milieu, qui finit par s'épuiser. A ce moment, pour assurer la perpétuité de l'espèce, le parasite doit aboutir à une forme de résistance, la spore (sporocyste), et très probablement la production de cette spore exige un acte sexuel. »

Cette opinion, que nous acceptons, met en évidence une analogie étroite entre les phénomènes sexués chez les coccidies et chez les infusoires ciliés, — indiquée aussi par Simond.

Le développement des ookystes, qui possèdent une grande résistance et ne mûrissent souvent qu'en dehors de l'individu hôte, nous permet de songer aussi à une analogie entre ces kystes et les œufs durables de certains animaux (Daphnies, Rotifères, etc), qui se reproduisent tantôt parthénogénétiquement, tantôt après fécondation. On sait en effet que les œufs fécondés, très résistants, se produisent surtout au moment où les circonstances extérieures amènent la mort de tous les adultes (dessèchement des marais, arrivée de l'hiver, etc.) ; les œufs parthénogénétiques ne se présentent qu'au moment où les conditions de vie sont excellentes et ils servent à une pullulation rapide des individus.

Les conditions favorables chez l'organisme infecté amènent de nombreuses reproductions asexuées et par suite une infection aiguë. Mais l'affaiblissement de l'organisme hôte, par suite peut être des lésions produites par le parasite), a toujours pour conséquence une formation abondante de kystes résistants. Dans l'intestin d'un lapin mort de coccidiose aiguë, Simond a trouvé (p. 549) que « un grand nombre de parasites sont près de s'enkyster... ou sont déjà enkystés. Beaucoup moins abondantes que les précédentes, se trouvent des formes de reproduction asporulée. » Et il ajoute que, parmi ces dernières, il y a beaucoup de stades à microgamètes (chromatozoïtes) qui ont un rôle à jouer dans l'acte sexué. Cette constatation nous fait penser que les kystes vus par l'auteur étaient fécondés.

Des faits exposés, il nous semble qu'on peut schématiser de la façon suivante le cycle évolutif d'*Adelea ovata* :

Sporozoïtes ♂/♀ < adultes ♂ → générations endogènes ♂ → microgamétocytes → microgamètes ↘ macrogamète fécondé → sporocystes à sporoïtes
adultes ♀ → générations endogènes ♀ → macrogamètes ↗

Chez les autres coccidies où, jusqu'ici, on n'a pas noté de dimorphisme sexuel, le cycle est le suivant :

[illegible] ⚥ → adultes indifférenciés — générations endogènes → formes à microgamètes → microgamètes ; → formes macrogamètes → macrogamètes > → macrogamète fécondé ou ookyste → Sporocystes à Sporozoïtes

Dans ce second schéma, le chaînon constitué par les générations endogènes peut ne pas exister, et un adulte indifférencié donner directement *un* macrogamète ; c'est le cas que nous avons fait connaître chez *Benedenia octopiana*. Il peut se rencontrer aussi, à titre accidentel, chez d'autres coccidies.

Nous pensons que des études plus approfondies montreront un dimorphisme sexuel semblable à celui d'*Adelea ovata* chez d'autres coccidies. Déjà, Simond indique une différence assez nette entre les formes adultes de *Coccidium oviforme* qui donnent les macrogamètes et celles qui donnent les microgamètes.

Notre manière d'envisager le cycle évolutif des coccidies, en complet accord avec celle de Simond, diffère un peu de celle de Léger [1], qui prétend qu'un sporozoïte issu d'un sporocyte, donne naissance à un « kyste » eimérien, et que les éléments endogènes se transforment en kystes coccidiens. C'est notre manière de voir schématisée à l'extrême et par suite rendue inexacte, pour la majorité des cas.

— En terminant, nous voulons critiquer brièvement le parallèle que Léger établit entre le cycle évolutif des grégarines (*sans multiplication endogène*) et celui des coccidies. Il prend pour base la ressemblance, simplement d'ordre physiologique, entre certains sporoblastes de grégarines et les jeunes macrogamètes des coccidies. Il arrive ainsi à assimiler les *ookystes coccidiens* aux *spores* (sporocystes) des grégarines. Les sporocystes ne seraient pas homologues dans les deux groupes. Tout cela paraît inexact *a priori*, car si l'on veut établir un parallélisme, il nous semble que le point de départ doit être une homologation des sporocystes coccidiens et grégariniens, ou, ce qui conduit au même résultat, des formes dans les deux groupes au moment de la copulation.

Mais, il y a plus ; Caullery et Mesnil [2] ont décrit chez une grégarine cœlomique d'une annélide, un stade de multiplication endogène, qu'ils ont trouvé dans l'épithélium intestinal et qui

1. Léger, *Bull. scient. France et Belgique*, t. XXXI.
2. Caullery et Mesnil, *C. R. Soc. Biol.*, 15 janvier 1898.

fournit des germes qui sont bien l'équivalent et l'homologue des formes eimériennes des coccidies. L'existence de ces éléments, qui ne sont pas placés dans le tableau de Léger, prouve manifestement que sa théorie n'est nullement adéquate aux faits.

La découverte de Caullery et Mesnil nous semble très importante, car elle montre la grande généralité du processus de multiplication endogène, si net chez les coccidies, et établit des liens nouveaux entre les deux grands groupes de sporozoaires : grégarines et coccidies.

Paris, 1er décembre 1898.

EXPLICATION DES PLANCHES I — III

Toutes les figures, observées avec le microscope Zeiss, ocul. 4, 6 et 12, obj. à immersion apochromatique de 2 millimètres ouvert. et 1,30 foyer, ont été dessinées à la chambre claire. Dans les figures 11-17 (pl. I), le pigment protoplasmique *p* brun foncé et représenté en violet. — Dans les pl. II et III, il est figuré avec sa valeur naturelle.

Fig. 1-3. — Évolution de la forme femelle mononucléaire.

Fig. 4-10. — Formation des macrogamètes.

Fig. 11-13. — Évolution de la forme mâle mononucléaire.

Fig. 14-17. — Formation des microgamétocystes.

Fig. 18-26. — Maturation d'un macrogamète et formation des microgamètes (fig. 18, 21 et 23 montrent le phénomène de l'épuration nucléaire du macrogamète; *l*, chromatine expulsée).

Fig. 27-31. — Union d'un macrogamète avec un microgamète.

Fig. 32-33. — Le noyau fécondé se porte à la surface de la cellule.

Fig. 34-35. — Divisions nucléaires pendant la formation des sporocystes.

Fig. 34. — Première division nucléaire; sur le filament unissant les deux noyaux, on distingue deux corps intermédiaires *z*.

Fig. 35. — Divisions nucléaires successives.

Fig. 36. — Individualisation des sporocystes.

Fig. 37. — Même stade, observé à l'état frais, et montrant les petits corpuscules réfringents *g* autour des taches nucléaires claires.

Fig. 38-39. — Évolution des sporocystes; *z* corps intermédiaires. (La moitie seulement de chacun des amas de sporocystes a été représentée).

Fig. 40. — Individualisation des deux sporozoïtes à l'intérieur d'un sporocyste; les noyaux se trouvent encore aux extrémités des sporozoïtes.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

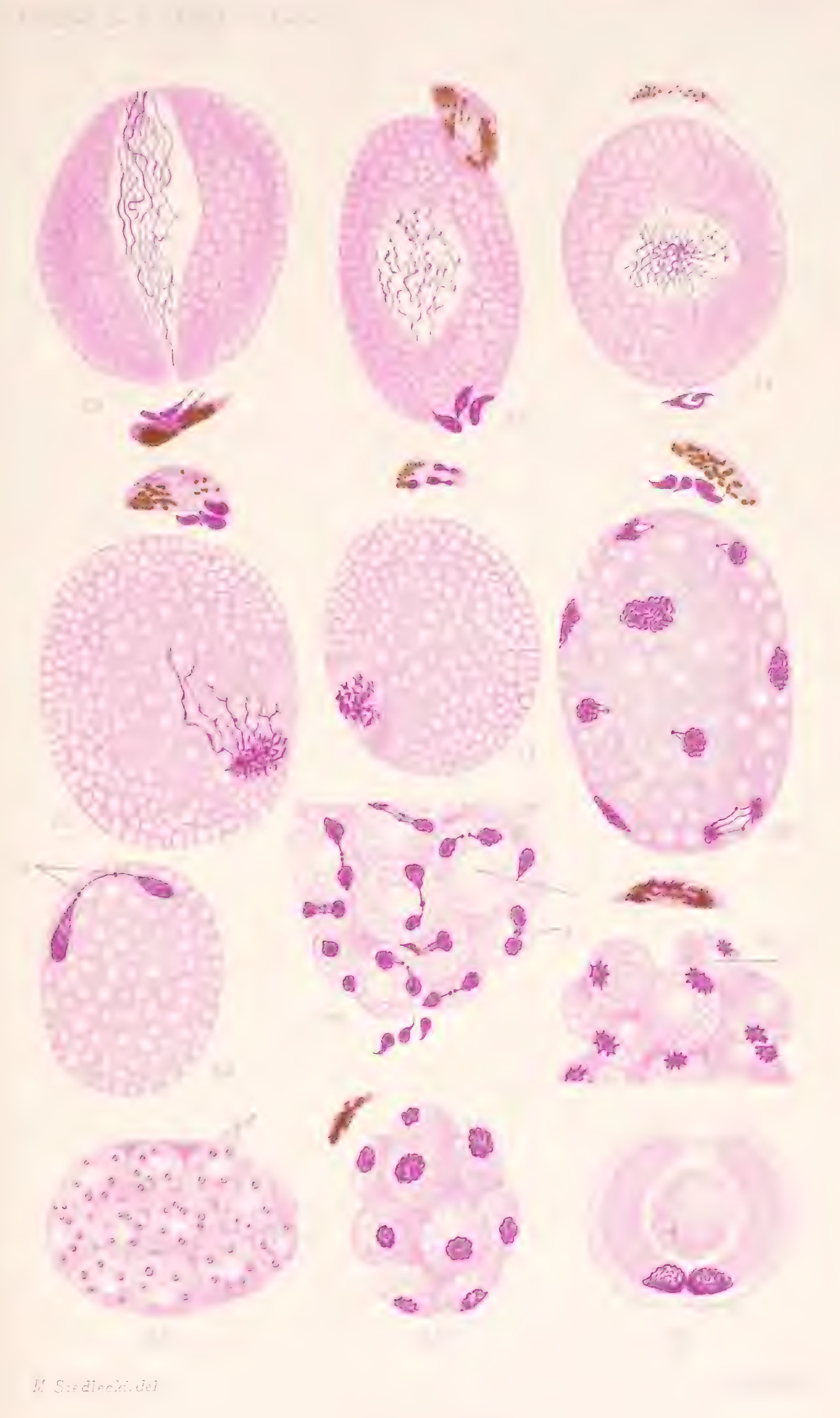


M. Siedlecki. del.

V. Roussel. lith.

Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris.




M. Siedlecki del.
Lafontaine Paris.

13me ANNÉE MARS 1899 N° 3

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ROLE DU PNEUMOCOQUE
DANS LA PATHOLOGIE ET DANS LA PATHOGÉNIE DE LA MALADIE DU SOMMEIL

Par le Dr E. MARCHOUX
Médecin principal des colonies

I. — IMPORTANCE DES AFFECTIONS A PNEUMOCOQUE.

Au mois de mars 1896, arrivait à Saint-Louis un détachement de tirailleurs sénégalais qui avaient été engagés au Soudan pour aller servir à Madagascar. Hâtivement recrutés, ils avaient été expédiés de Kayes sans être habillés. Fatigués par le voyage pénible du fleuve, qui dure à cette époque 40 jours en chalands, mal nourris, ils étaient encore insuffisamment vêtus pour passer d'un climat très chaud à une région relativement froide comme celle de Saint-Louis, où la température tombe pendant la nuit à 16 ou 18° avec grand vent.

Aussi ont-ils débarqué dans un état de santé très précaire, après avoir même laissé quelques-uns d'entre eux dans les ambulances des postes du fleuve. Le jour même de l'arrivée, 6 hommes ont été amenés à l'hôpital atteints de pneumonie, et les entrées se sont succédé quotidiennement pendant tout leur séjour dans la ville.

Un mois plus tard, un nouveau convoi arrivait dans les mêmes conditions, avec les mêmes accidents, et fournissait autant de malades. En somme, du 23 mars au 3 mai, dans ces deux groupes de tirailleurs, 48 ont été atteints d'affections pneumococciques. Parmi ces 48 malades, il s'est produit 12 décès.

L'effectif total étant de 200 hommes, il y a donc eu 24 0/0 de malades avec 6 0/0 de décès.

Les renseignements qui nous sont parvenus ultérieurement nous ont appris que ce mauvais état sanitaire s'était continué pendant toute la durée du voyage à Dakar, et sur le *Paraguay* qui les a transportés à Madagascar.

Nous avions pensé tout d'abord qu'une pareille épidémie était un accident peu commun sur la côte d'Afrique, et qu'elle tenait uniquement aux conditions exceptionnelles dans lesquelles s'étaient trouvés nos tirailleurs. Mais nous n'avons pas tardé à nous convaincre que les affections à pneumocoque, loin d'être rares chez les peuples du Sénégal, formaient, au contraire, la majorité des affections aiguës dont sont atteints les indigènes. Depuis 3 ans, aussi bien les noirs de Saint-Louis que ceux des environs qu'il nous a été permis de voir nous en ont donné trop souvent la preuve. Pour citer des chiffres, nous avons pu relever en moins de 2 ans et demi, sur le registre des entrées de l'hôpital, 184 malades atteints de pneumonie plus ou moins grave. Si l'on tient compte qu'on n'y reçoit que la population militaire, dont l'effectif moyen est de 600 hommes environ, si l'on sait que ces hommes ne vivent point casernés, mais qu'ils habitent le village au même titre que la population civile, on comprendra rapidement quelle importance prend le pneumocoque dans la pathologie de notre colonie.

Un autre exemple encore plus frappant fera ressortir la gravité d'un fléau qui finit par faire plus de victimes qu'une grande épidémie, car il se renouvelle périodiquement sans doute depuis de longues années.

Au mois de mars 1898, le chef de la province du Oualo informait l'administration que la mortalité s'élevait à d'énormes proportions dans les populations qu'il administre. L'affection qui régnait, disait-il, ressemblait à une épidémie de tétanos. Les gens étaient pris presque subitement, et ne tardaient pas à mourir avec de la raideur de la nuque et une forte fièvre.

Notre adjoint, M. le D[r] Marotte, fut envoyé dans cette région où il put voir beaucoup de malades présentant effectivement les symptômes décrits par le chef de la province. L'outillage restreint dont disposait M. Marotte, la difficulté de faire accepter les autopsies par des gens aussi primitifs, et de les exécuter

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS

Pr. n° 141.

JOURNAL
DE
Physiologie
ET DE
Pathologie générale

PUBLIÉ PAR

MM. BOUCHARD ET CHAUVEAU

Comité de Rédaction :

MM. J. COURMONT, E. GLEY, P. TEISSIER

Sommaire du n° 1. — 15 Janvier 1899.

TRAVAUX ORIGINAUX. — I. De l'action de la vératrine sur les muscles rouges et blancs du lapin, par **J. Carvallo** et **G. Weiss.** — II. Du sort de la toxine tétanique chez la grenouille froide ou chauffée, par **Jules Courmont** et **Doyon.** — III. Des variations du fer dans les organes des animaux dératés, par **Alessandro Tedeschi**. — IV. Contribution à l'étude de l'innervation motrice de l'estomac, par **D. Courtade** et **J.-F. Guyon**. — V. Etude sur quelques faisceaux descendants de la moelle, par **André Thomas.** — VI. Troubles respiratoires dans quelques cas d'affections du système nerveux, par **Max Egger.** — VII. Carbone urinaire et coefficients urinaires, par **Ch. Bouchard.** — VIII. Tares hépatiques expérimentales chez les rejetons des femelles tuberculeuses, par **A. Charrin.** — IX. Des troubles comparés de la sensibilité étudiés chez les mêmes malades aux trois périodes de la paralysie générale, par **E. Marandon de Montyel.** — X. De la conductibilité calorifique des étoffes employées pour les uniformes de l'armée, par **H. Bordier** et **P. Kolb.** — XI. Technique de la détermination du pouvoir absorbant du sang et de l'hémoglobine pour l'oxyde de carbone, par **L.-G. de Saint-Martin.** — XII. La chlorophylle du foie chez les mollusques, par **A. Dastre.**

ANALYSES. — Physiologie. — Pathologie générale.

Sommaire du n° 2. — 15 Mars 1899.

TRAVAUX ORIGINAUX. — I. De l'élasticité et des forces de tension dans les muscles en état de contraction statique volontaire, par **A. Chauveau** et **F. Laulanié.** — II. Nouveaux moyens d'étude de l'élasticité et des forces de tension dans les muscles en contraction statique volontaire, par **J. Tissot.** — III. Des procédés de dosage du glycogène et de la glucose dans le foie (étude critique), par **L. Garnier.** — IV. La densité des muscles dans la série des vertébrés, par **J. Carvallo** et **G. Weiss.** — V. Application du bioxyde de sodium à la régénération de l'air confiné, par **A. Desgrez** et **V. Balthazard.** — VI. Des erreurs commises dans l'évaluation de la surface de section transversale des

muscles, par **J. Carvallo** et **G. Weiss**. — VII. Action du tannin sur la diurèse et sur l'élimination des corps xantho-uriques, par **J. Sabrazès** et **M. Frézals**. — VIII. Le sort des toxines introduites dans le tube digestif, par **Charrin** et **Levaditi**. — IX. Nerfs accélérateurs du cœur et respiration, par **E. Wertheimer** et **L. Lepage**. — X. Etude sur la toxicité de la sueur de l'homme en bonne santé, par **S. Arloing**. — XI. Sur les effets de la ligature simultanée du canal cholédoque et du canal thoracique, par **E. Wertheimer** et **L. Lepage**. — XII. Etude expérimentale de l'intoxication par la sueur, par **S. Arloing**. — XIII. Recherche et dosage de la pepsine dans le contenu gastrique des dyspeptiques, par **G. Linossier**. — XIV. Mécanisme des tares développées chez les descendants sous l'influence des maladies des ascendants, par **Charrin** et **Nattan-Larrier**. — XV. Contribution à l'étude des fibres à trajet descendant dans les cordons postérieurs de la moelle épinière, par **J. Dejerine** et **A. Theohari**. — XVI. La surcorrection accommodative de l'aberration de sphéricité de l'œil, par **Tschernig**. — XVII. Détermination du pouvoir émissif des draps employés pour les uniformes de l'armée, par **H. Bordier** et **Kolb**. — XVIII. A propos de la conductibilité à la chaleur des tissus de l'organisme, par **Charrin** et **Guillemonat**.

ANALYSES. — Physiologie. — Pathologie générale.

CONDITIONS DE LA PUBLICATION

Le Journal de Physiologie et de Pathologie générale *paraît tous les deux mois dans le format grand in-8°, avec planches hors texte et figures dans le texte.*

Chaque numéro contient, outre les mémoires originaux, un index bibliographique de 30 à 40 pages comprenant l'analyse sommaire des travaux français et étrangers de physiologie et de pathologie générale.

L'année formera un volume d'environ 1,200 pages.

PRIX DE L'ABONNEMENT :

Paris : **28** francs. — France et Union postale : **30** francs.

BULLETIN D'ABONNEMENT

A retourner à la Librairie MASSON ET Cie

Veuillez m'inscrire pour un abonnement au Journal de Physiologie et de Pathologie générale *pendant l'année 1899.*

Ci-joint un mandat sur la poste de la valeur de .... fr.

Nom du Souscripteur : ....

Adresse :

SIGNATURE :

Paris. — L. Maretheux, imprim., 1, r. Cassette.

discrètement dans un village à population dense, ont malheureusement empêché notre aide de recueillir un grand nombre de renseignements. Il put cependant adresser au laboratoire quelques pipettes de sang retiré aseptiquement des veines du pli du coude chez quelques malades.

Grâce à l'autorité du chef, il réussit à pratiquer une autopsie et à envoyer des pièces. Mais à partir de ce moment les difficultés augmentèrent encore, et il eut les plus grandes peines à approcher les malades. Du matériel envoyé, il fut possible cependant de tirer de précieux renseignements.

Quatre séries de pipettes, provenant de quatre malades, ont été examinées et ensemencées. Le microscope ne permit de trouver aucun microbe. Mais l'ensemencement, négatif pour trois d'entre elles, donna pour la quatrième une culture pure de pneumocoques.

Les pièces d'autopsie, pulpes de foie et de rate, liquide céphalo-rachidien, et pulpe cérébrale, furent ensemencées. Toutes donnèrent des cultures de pneumocoques, associés à du bactérium coli dans le foie et dans la rate, pures dans le liquide céphalo-rachidien.

Ces constatations, jointes aux caractères cliniques relevés sur les malades, permettent d'affirmer que nous étions en présence d'une épidémie de méningite cérébro-spinale à pneumocoques.

Les pneumonies devaient être certainement très nombreuses dans les villages atteints, mais elles n'ont pas été signalées ni connues. Outre que les noirs n'attribuaient pas aux méningites si rapidement mortelles la même origine qu'à ces affections pulmonaires dont ils s'inquiètent peu en général, ils ont une très grande répugnance à consulter les médecins européens. Quand on fit le dénombrement des décès survenus par suite de méningite dans les trois mois où sévit la maladie, on constata, non sans étonnement, qu'ils atteignaient le chiffre de 200 en nombre rond dans une population de 20,000 habitants environ.

II. — Étiologie.

A quoi attribuer la fréquence de telles affections parmi les noirs, quand les Européens, résidant dans la colonie, y sont tellement insensibles qu'en cinq années de séjour au Sénégal, il ne

nous a pas été donné d'observer un seul cas de pneumonie franche chez eux. La race indigène manifeste à la vérité une sensibilité particulière dont témoigne la fréquence des généralisations; mais on va voir que la manière de vivre de ces populations laisse autant de place aux causes prédisposantes qu'à la contagion. Le climat du Sénégal présente des variations assez grandes, contre lesquelles les noirs ne savent point se défendre. A la saison chaude et humide qui dure de juillet à novembre, et où le thermomètre reste presque continuellement entre 26° et 35°, succède assez brusquement une période d'hiver pendant laquelle la température, qui peut s'élever dans la journée, quand souffle le vent d'Est, à 35° et même 38°, tombe jusqu'à 15° à Saint-Louis et plus bas encore dans l'intérieur. Une forte brise accentue souvent l'effet de ces variations, contre lesquelles l'Européen est obligé de se protéger par des vêtements très chauds.

Les noirs, au contraire, sont absolument dépourvus de moyens de défense. Ils habitent des cases en paille dont les parois, formées de nattes grossières et peu serrées, sont très minces. Il y fait très chaud pendant le jour, très froid pendant la nuit. Le vent y pénètre de tous côtés à travers la muraille, et les habitants ne lui opposent aucune couverture, presque aucun vêtement.

Les étoffes de laine, en usage autrefois au Sénégal, ont cédé la place aux cotonnades anglaises avec lesquelles les noirs s'habillent aujourd'hui presque exclusivement. Une pièce d'étoffe pour le torse compose le *boubou*, une autre pour la moitié inférieure du corps forme le *pagne*. Comme beaucoup de primitifs, ils ne savent se protéger du froid qu'en ajoutant d'autres pagnes et d'autres boubous à ceux qu'ils portent. Encore ce luxe n'est-il permis qu'aux gens riches. Les autres n'ont qu'un seul vêtement qu'ils laissent flotter ou dans lequel ils s'enroulent.

Pour les enfants, quand ils sont vêtus, c'est d'une simple chemise. Disons en passant que c'est dans la population infantile que la mortalité est la plus élevée.

Il est presque inutile de dire que le lit se compose d'une simple natte ou d'une paillasse sans couverture.

Comment s'étonner, quand on sait l'importance du refroidissement dans le développement des maladies et de la pneumonie en particulier, que cette dernière affection fasse tant de victimes?

L'absence des soins les plus élémentaires de propreté et d'hygiène rend facile le transport des germes.

Dans ce pays où l'eau est rare, on ne se lave guère. Les ablutions prescrites par la religion musulmane se font avec du sable ou quelques cuillerées d'eau. C'est la pluie qui est chargée du blanchissage du linge.

La promiscuité est très grande : les nègres vivent souvent au nombre de 7 ou 8 dans une case de 9 mètres carrés.

Le plat est commun, chacun y puise avec la main dans laquelle il se mouchait un instant auparavant.

Tout le monde crache sans précautions sur le sol formé presque partout de sable marin.

Enfin les noirs, quelquefois très pusillanimes devant la moindre douleur, promènent assez facilement leur pneumonie sans se plaindre, répandant partout le pneumocoque sur le sol.

C'est ainsi qu'on a pu voir tomber, dans les rangs, des tirailleurs qui ne s'étaient point fait porter malades et qui mouraient 12 heures plus tard de méningite suppurée.

III. — Maladie et microbe.

Des noirs, vivant dans des conditions hygiéniques aussi déplorables, offrent au pneumocoque un terrain de culture particulièrement favorable.

La pneumonie franche est rare chez eux ; la maladie est envahissante et peut atteindre toutes les séreuses. Les complications articulaires sont cependant peu communes ; mais la pleurésie existe toujours, la péricardite souvent : le péritoine et la vaginale sont quelquefois atteints.

Nous avons même rencontré chez un enfant une pneumonie, accompagnée seulement de vaginalite purulente, qui a parfaitement guéri après ouverture et évacuation du pus. Mais de toutes les complications, la plus grave et malheureusement celle qui n'est pas la moins rare, c'est la méningite cérébro-spinale. Nous l'avons même vu exister seule sans pneumonie chez un certain nombre d'individus, et nous en avons relaté ailleurs 3 observations [1].

1. *Archives de médecine navale et coloniale*, 1896.

Dans ce cas, l'infection des méninges se fait la plupart du temps par les sinus frontaux, que nous avons trouvés dans les 2/3 des cas remplis du même pus à pneumocoques.

La méningite à pneumocoques ne présente au Sénégal aucun caractère qui la distingue de celle qu'on observe en Europe. La forme comateuse avec raideur de la nuque est de beaucoup la plus commune; le délire actif est rarement constaté. Les autopsies révèlent le plus généralement la présence de ce pus concret, pseudo-membraneux, qui a été maintes fois décrit; d'autres fois, on ne trouve le long des vaisseaux de la convexité que des traînées laiteuses chargées de pneumocoque. Enfin, dans quelques cas à terminaison très rapide, le microbe existait très abondamment dans le liquide céphalo-rachidien augmenté de volume, sans qu'il y ait aux méninges de traces microscopiques d'inflammation.

L'examen microscopique et les cultures ont décelé la présence, le plus fréquemment exclusive, du pneumocoque encapsulé. Deux fois sur 19 autopsies, nous l'avons trouvé associé au streptocoque, une fois au coli-bacille.

Jamais, malgré des recherches attentives, nous n'avons constaté la présence du *diplococcus intracellularis* de Weichselbaum, même dans les cas de méningite sans pneumonie. Au lieu d'un aspect arrondi, le pneumocoque affectait plutôt une forme tellement allongée en flamme de bougie qu'on pouvait le prendre à un examen superficiel pour un diplo-bacille. Mais par la coloration de Gram, on pouvait s'assurer que chaque élément était en voie de segmentation, et qu'on se trouvait en présence d'une chaînette de deux diplocoques.

En gélose, il donnait des colonies en buée de rosée, poussait dans le bouillon en formant des courtes chaînettes, dans le sérum liquide sous forme de diplocoques encapsulés. Très virulent pour le lapin, le cobaye et la souris quand on l'inoculait avec du liquide céphalo-rachidien, il baissait rapidement de virulence dès la première culture. Là où 1/4 de c. c. suffisait pour amener la mort d'un lapin en 24 heures, il en fallait un c. c. et quelquefois plus quand on se servait de la première culture en bouillon. Mais nous avons constaté qu'un pneumocoque dépourvu de virulence pour le lapin et le cobaye, tuant encore à peine la souris, reprenait facilement toute sa virulence si on

le cultivait pendant 24 heures dans un bouillon mélangé de 1/5 de sang de noir. Chose curieuse, le sang d'Européen ne produit pas à beaucoup près la même exaltation, comme en témoigne l'expérience suivante.

Un même pneumocoque, tuant la souris en 48 heures, ne tuant ni le lapin ni le cobaye, est mis à cultiver pendant 24 heures :

1° Dans un ballon contenant 40 c. c. de bouillon de bœuf peptonisé et 10 c. c. de sang de noir, prélevé aseptiquement à une veine du pli du coude;

2° Dans un ballon renfermant 40 c. c. du même bouillon additionné de 10 c. c. de sang d'Européen.

Au bout de 24 heures, on inocule deux séries de lapins.

1re Série.

Bouillon n° 1..........	Lapin I reçoit $\frac{1}{4}$ c. c.; meurt en 36 heures. Lapin II reçoit 1 c. c.; meurt en 24 heures. Lapin III reçoit 2 c. c.; meurt en 24 heures.

2e Série.

Bouillon n° 2..........	Lapin I reçoit $\frac{1}{4}$ c. c.; survit. Lapin II reçoit 1 c. c.; survit; meurt un mois plus tard de paralysie ascendante. Lapin III reçoit 2 c. c.; meurt en 48 heures.

Le sang de noir semble donc un milieu de choix pour la culture de ce microbe, qui s'y conserve d'ailleurs très longtemps virulent puisque, deux mois plus tard, 1 c. c. de ce bouillon n° 1 tuait encore le lapin sans nouvelle culture.

Le bouillon n° 2 était à la même date totalement dépourvu de virulence.

Nous avons pu conserver pendant plus de 6 mois du pneumocoque virulent à très petite dose dans du liquide pleurétique provenant d'un indigène. A cette date, le liquide, citrin au début, avait pris une couleur vert bouteille foncé sans que la culture cessât d'être pure.

Avant de terminer ce qui a trait au microbe, il convient de signaler que dans toutes les autopsies nous avons pu constater un fait sur lequel a insisté récemment un auteur italien, Righi, à savoir que le pneumocoque se rencontrait dans le sang et dans tous les organes. Sur le vivant, dans un tiers des cas à la

période d'état de la pneumonie, et dans les 4/5 des cas de méningite cérébro-spinale, nous avons pu, en retirant aseptiquement 5 c. c. de sang, obtenir des cultures pures et virulentes de pneumocoque.

IV. — Pneumocoque et maladie du sommeil.

Tous les cas de méningite cérébro-spinale ne se terminent pas par la mort. Un certain nombre guérit sans laisser de traces. Mais dans quelques cas le retour à la santé n'est pas complet, l'inflammation a laissé dans les méninges des lésions durables, méningo-encéphalite diffuse, dont les symptômes cliniques constituent le tableau de ce qu'on est convenu d'appeler maladie du sommeil.

L'histoire de cette affection ne fut connue pendant longtemps que par le récit qu'en faisaient les voyageurs. On l'a tour à tour attribuée à un empoisonnement ou à un virus, connu de certaines gens qui s'en servaient dans un but criminel. Aujourd'hui encore les indigènes la considèrent comme une malédiction du ciel ou des sorciers, et cachent avec soin les malades, qu'on ne peut, en général, approcher que par surprise.

Ces conditions ont contribué à en rendre l'étude beaucoup plus difficile. Aussi les descriptions écourtées qu'on en trouve dans les auteurs anciens donnent un tableau très infidèle de la maladie. Calmette a publié en 1888, dans les *Archives de Médecine navale*, l'observation très intéressante d'un cas qu'il a observé au Gabon, et à propos duquel il insiste sur les lésions des méninges. Il a constaté à l'autopsie des signes de méningo-encéphalite, surtout marqués du côté du cervelet. Les lésions pie-mériennes s'étendaient au bulbe et à la moelle.

Dans ces derniers temps on a voulu, à distance, trouver quelques rapports entre le myxœdème et la maladie du sommeil. Mais ce rapprochement ne se justifie qu'à certains points de vue.

M. Régis et Gaide ont publié dans la *Presse Médicale* [1] l'analyse d'un cas observé aux environs de Tombouctou, et ils concluent à une méningo-encéphalite diffuse d'origine infectieuse.

Ce cas, observé à plus de 2,000 kilomètres de la côte, de même

1. Régis et Gaide, Rapports entre la maladie du sommeil et le myxœdème. *Presse Médicale*, 1er octobre 1898.

que celui de Calmette au Gabon et de plusieurs autres sur d'autres points de la côte occidentale d'Afrique, détruisent cette opinion, accréditée depuis longtemps au Sénégal, que la maladie était localisée dans une province limitrophe de la mer et peuplée par les Sérères. Tout ce qu'on peut dire en faveur de cette pseudo-localisation, c'est qu'en effet la maladie du sommeil semble plus commune dans les provinces Sérères que dans les pays Ouoloffs. Cela tient sans doute à ce que les Sérères féticheurs sont en même temps des buveurs d'alcool, tandis que les autres sont musulmans et se privent d'alcool. Il convient d'ajouter aussi que l'hygiène du vêtement est encore plus rudimentaire chez les premiers que chez les seconds.

C'est dans les provinces Sérères que nous avons pu, à grand'-peine et grâce au bienveillant concours de l'administration, nous procurer les deux malades dont nous allons donner les observations.

Le premier, M., catholique, est né à Kita, qu'il a quitté dans son enfance. Habite à Saint-Joseph dans les provinces Sérères depuis 19 ans. A eu souvent de la fièvre qui a guéri sans soins. Affirme qu'il n'a jamais eu ni chancre, ni autre accident syphilitique. Prétend n'avoir jamais été sérieusement malade, sauf depuis deux mois où il souffre presque constamment de la fièvre. Le thermomètre accuse en effet une température de 38°,7.

Sa maladie a débuté par de la toux et de violents maux de tête. Actuellement il tousse encore beaucoup et crache abondamment. Le nez est le siège d'un écoulement purulent jaunâtre.

Les signes stéthoscopiques permettent de reconnaître un engouement des deux bases pulmonaires, avec submatité et râles muqueux répandus partout. Les ganglions cervicaux et sous-maxillaires sont gros et durs.

Le malade louche un peu, le regard est distrait, l'œil brillant, l'attention difficile à fixer longtemps, le caractère facilement irritable, le verbe haut. Il se plaint de maux de tête. N'accuse pas de gêne respiratoire.

Il répond assez nettement aux questions qui lui sont adressées.

L'écoulement nasal jaune verdâtre contient de nombreux pneumocoques qu'on isole assez facilement en cultures pures et qui tuent la souris.

Les crachats denses, jaunes, contiennent de nombreux glo-

bules de pus et des filaments de fibrine. On y trouve le pneumocoque virulent en grande abondance.

Pendant son séjour à l'hôpital, du 1er août au 7 septembre, le malade a été soumis au traitement anti-syphilitique sans qu'il se manifestât dans son état une amélioration sensible.

Pendant le premier septennaire, la température s'est maintenue aux alentours de 39°, puis est descendue dans la suite, atteignant souvent la normale le matin, mais s'élevant presque chaque soir de 37°,6 à 38°.

L'état général a présenté peu de modifications. Les signes stéthoscopiques ont disparu du côté du poumon. L'écoulement nasal s'est tari.

Mais les ganglions sont restés volumineux, et le malade a accusé pendant une dizaine de jours de la gêne douloureuse pour mouvoir la tête.

La physionomie a conservé le même cachet. Le malade, dont l'attention était quelquefois vivement sollicitée par des causes insignifiantes, restait le plus souvent indifférent à ce qui se passait autour de lui. Il était presque constamment étendu sur son lit dans un demi-sommeil. Quand on l'interrogeait, il prétendait qu'il se portait très bien, et il demandait avec insistance qu'on lui donnât son *exeat* ou qu'on lui permît de travailler.

A plusieurs reprises, on a tenté de lui confier quelques petits ouvrages qu'il n'a pas tardé à abandonner pour retomber dans sa somnolence. Enfin le 7 septembre, pour des raisons d'ordre pécuniaire, il est renvoyé de l'hôpital. Depuis cette époque nous l'avons perdu de vue.

En somme, cet homme a été atteint d'une pneumonie, dont on a pu à l'hôpital constater les symptômes terminaux. La rhinite dont il était porteur témoignait d'une affection des sinus, d'origine pneumococcique comme celles dont nous avons constaté la présence dans les autopsies de méningite cérébro-spinale que nous avons faites. Les troubles cérébraux observés chez lui permettent de penser que les méninges ne sont pas restées insensibles à ce voisinage, et qu'elles ont été le siège d'une inflammation dont les suites ont entraîné de la méningo-encéphalite diffuse.

Le deuxième sujet, au lieu d'être au début, était à la période

d'état de la maladie quand il nous est arrivé à l'hôpital le même jour.

Son état ne lui permet de donner aucun renseignement ni sur ses antécédents, ni sur les débuts de sa maladie.

Il a la peau un peu sèche, écailleuse à la face externe des jambes. Elle est le siège d'un peu de prurit. La sensibilité est bien conservée. On constate un léger œdème des extrémités inférieures.

Le malade est bien musclé et nullement amaigri. Il ne porte pas de traces d'atrophies. L'activité fonctionnelle des muscles est à peu près conservée. Il cherche cependant un point d'appui pendant la marche, traîne un peu la jambe gauche et n'appuie pas à terre le talon du même côté. Quand on lui demande de serrer la main. l'effort est très faible, mais il semble que ce soit l'influx de la volonté qui fasse surtout défaut.

Le tibia droit porte la trace d'une fracture ancienne dont on perçoit encore le cal.

A quatre travers de doigt au-dessus de la malléole interne gauche, on trouve une légère exostose douloureuse à la pression. Le malade a conservé son appétit, il a même un peu de boulimie. Il digère bien. quoiqu'il ait plusieurs fois par jour des selles pâteuses. Les dimensions de la rate et du foie ne sont pas augmentées.

Le cœur est normal comme volume et comme bruit. Les artères sont un peu dures et roulent sous le doigt : le pouls est lent. Aucun signe stéthoscopique ne révèle de lésion aux poumons. Les mouvements respiratoires sont inférieurs comme nombre à la normale.

Pas de polyurie, mais les urines contiennent une grande quantité d'albumine.

Tous les ganglions lymphatiques sont durs et augmentés de volume : les ganglions cervicaux surtout forment un paquet si gros que le malade semble atteint d'oreillons.

Tact conservé, ouïe intacte.

La vue paraît bonne. De temps en temps il y a du strabisme, l'œil droit est dévié en haut et en dehors. Pas d'inégalité pupillaire. Réaction parfaite à la lumière.

Odorat et goût très obtus.

Le malade est dans un état de déchéance intellectuelle des

plus prononcés. Chaque fois qu'on lui adresse la parole, il est pris d'un rire stupide et ne répond que lentement par monosyllabes à demi bredouillés.

La volonté est surtout très affaiblie. Il obéit aux directions qui lui sont imprimées, mais est incapable de se diriger seul.

Il s'intéresse peu à ce qui se passe autour de lui; quand il entend un bruit un peu fort, il marque son attention par le même rire imbécile.

Il reste continuellement étendu sur son lit, mais ne dort point constamment : il est plutôt dans un état d'hébétude tranquille. Il se lève, quand on le prévient, pour prendre sa nourriture, mange aussi proprement que ses camarades.

Pas de relâchement des sphincters.

Il se lève aussi pour aller à la selle, mais s'inquiète peu du vase, sur lequel on doit le diriger.

Pas de tremblement des mains, des lèvres, ni de la langue.

Les réflexes rotuliens sont conservés.

La température est restée normale, avec quelques ascensions vespérales jusqu'aux environs de 38°.

Est évacué le 22 août sur l'hôpital civil dans le même état. Comme l'autre, il a été soumis sans bénéfice au traitement antisyphilitique. Jusqu'au 10 octobre la situation du malade s'est maintenue sans grand changement : à cette date il a été pris de fièvre. Pas de symptômes pulmonaires, mais dyspnée assez forte.

Il succombe le 20 octobre au soir, et le 21 au matin nous faisons l'autopsie. Nous constatons une adénite de tous les ganglions.

Les ganglions cervicaux, bronchiques, de l'aisselle et de l'aîne sont les plus volumineux. Ils sont durs et violacés. A la coupe, ils sont rouge foncé, parsemés de taches blanches qui font ressembler la surface de section à une mosaïque.

Le gros intestin est plein de cybales. — La rate est petite, dure, sclérosée. — Le foie est gras. — Les reins petits, blancs, sont envahis par le tissu conjonctif.

Le poumon droit est sain, la plèvre du même côté est maintenue par une adhérence peu étendue, siégeant en arrière et à la partie moyenne.

Le poumon gauche est couleur lie de vin, très congestionné.

La plèvre est adhérente sur toute sa surface. Il est impossible de retirer le poumon sans le déchirer. Celui-ci crépite bien, mais par l'expression il laisse échapper une spume jaunâtre.

Le péricarde est rempli par un exsudat pseudo-membraneux jaune, verdâtre, recouvrant les deux feuillets.

Ces fausses membranes renferment une véritable culture de pneumocoques virulents.

A l'ouverture de la boîte crânienne, les sinus sont examinés et ne contiennent pas de pus.

Pas de pachyméningite interne ni externe.

La surface convexe des deux hémisphères a un aspect laiteux, surtout marqué le long du trajet des vaisseaux. La pie-mère est épaisse, très adhérente à la couche corticale, dont on ne peut la séparer sans amener des déchirures. Pas de noyaux de ramollissement. Les vaisseaux sont dilatés, gorgés de sang.

A la coupe du cerveau, on remarque un piqueté rouge de toute la surface de section. En déchirant le tissu, des capillaires sont étirés et finalement pendent à la surface comme autant de fils. La substance grise est pâle.

Les ventricules sont gorgés de liquide clair. Le liquide céphalo-rachidien est augmenté de volume. Comme nous le disons plus haut, le péricarde contient du pneumocoque pur.

Le liquide céphalo-rachidien, la pulpe et les ganglions de tous les organes ont été ensemencés et ont donné des cultures diverses de coccus et de coli-bacilles, mais pas de pneumocoques [1].

Cette observation semble calquée sur celle de MM. Régis et Gaide, au moins dans sa première partie, à cette différence que nous n'avons pas plus constaté chez notre deuxième malade que chez notre premier, d'augmentation de volume du corps thyroïde. Peut-être pourrait-on penser, comme l'autopsie du malade de Tombouctou n'a pas été faite, que les paquets ganglionnaires qui s'étendent le long des vaisseaux cervicaux, de chaque côté du corps tyroïde, ont pu en imposer pour une tumé-

1. En somme, les lésions que nous avons trouvées au poumon gauche nous permettent, croyons-nous, de penser que notre malade a été d'abord atteint de pleuro-pneumonie accompagnée de méningite cérébro-spinale. Après avoir guéri de cette affection, non sans avoir conservé des lésions durables de la substance corticale du cerveau, il a succombé à une reprise du pneumocoque qui, après avoir sommeillé dans un coin de l'organisme, a déterminé la péricardite végétante que nous avons constatée à l'autopsie.

faction de cet organe. Quoi qu'il en soit, notre observation ne fait que confirmer celle des deux auteurs précités, et la conclusion est qu'il faut considérer la maladie du sommeil comme une méningo-encéphalite diffuse, d'origine infectieuse.

Nous ne prétendons pas qu'un pareil état pathologique soit toujours l'œuvre d'un seul et même germe, mais les deux observations et la fréquence au Sénégal des affections à pneumocoque nous donnent le droit de penser que le microbe de Talamon-Fränkel en est l'agent producteur par excellence.

V. — Essais de traitement sérothérapique.

Nous ne voulons pas terminer cette étude sans parler de quelques essais de traitement par le sérum de convalescents, essais qui ont été tentés en 1896 avec notre excellent ami le Dr Clouard, à cause des circonstances particulièrement favorables dans lesquelles nous nous trouvions.

Le deuxième convoi de tirailleurs est arrivé à Saint-Louis à la fin de mars, au moment où un certain nombre des malades du premier détachement étaient guéris depuis quelque temps.

Les résultats publiés par les frères Klemperer étaient trop encourageants pour que nous ne tentions pas de les répéter.

Nous avons donc choisi trois convalescents de pneumonie grave, auxquels nous avons retiré aseptiquement, d'une veine du pli du coude, un poids total de 1,400 grammes de sang qui nous ont fourni 750 grammes de sérum.

Ces trois hommes étaient guéris depuis 21, 23 et 28 jours quand nous avons pratiqué la saignée.

Quatre malades ont été soignés. Le premier était en traitement depuis quatre jours pour une pneumonie double, quand il est pris d'écoulement nasal avec céphalalgie frontale tellement violente qu'elle nous fait craindre une méningite. La température est à 41°. On lui injecte le 28 avril 50 c. c. de sérum sous la peau de l'abdomen.

Le lendemain, le malade se sent un peu mieux, la céphalalgie est toujours considérable, mais moins violente que la veille. — T. le matin : 39°, 5. — Il reçoit encore une dose de 40 c. c. de sérum. Le soir, état général meilleur. — T. 40° — Céphalalgie presque disparue, écoulement nasal tari.

Le 30 avril, la crise se produit. — T. 37°,9.

Le malade entre en convalescence.

Le deuxième malade, B, est en traitement depuis 5 jours pour une pneumonie double avec pleurésie à droite.

Délire constant, fièvre très forte. — T. 40°,9. — Reçoit le 28 avril 50 c. c. de sérum sous la peau de l'abdomen.

Le lendemain, mieux à peine sensible, moins de délire. — T. 40°. — Nouvelle injection de 50 c. c. de sérum. Le soir, la température atteint 40°,2.

Le 30 avril, état général meilleur, le délire a presque cessé. — T. 39°,9. — 50 c. c. de sérum sont encore injectés. Le soir, le mieux se continue. — T. 39°,8.

Le 1er mai, la température est à 38°,8, le malade se sent bien, râles crépitants de retour dans le poumon gauche. On cesse le traitement et le malade se remet petit à petit.

Le 3 mai, il demandait à manger et entrait en convalescence. Sa pleurésie était en bonne voie de guérison.

Le troisième malade, S., avait une pneumonie à droite, accompagnée de pleurésie. Il paraissait convalescent quand il est pris de délire violent avec fièvre. — T. 39°,9. — Les yeux hagards et brillants. Pas de raideur de la nuque. Pas d'écoulement nasal, pas d'otite. Cependant nous craignons une méningite, et le 29 avril on lui injecte 50 c. c. de sérum.

Le lendemain, pas de modification dans l'état général. T. 39°,7, le matin; 40°,7, le soir. Injection de 50 c. c. de sérum.

Le 1er mai, l'état est le même le matin. — T. 39°,7. — 50 c. c. de sérum.

Le soir, la température est à 39°,6, le malade est plus calme.

Le 2 mai, T. 39°. Le délire a cessé. 30 c. c. de sérum. — Le soir, T. 39°,1.

Le lendemain, le malade revenait à la santé, la température était de 38°,2. Le traitement a été supprimé. Peu à peu S. s'est remis complètement, et il sortait 18 jours après absolument guéri.

Le quatrième malade, C., avait une pneumonie légère dont il semblait convalescent, quand la fièvre se rallume le 28 avril.

Température très élevée. Symptômes de péricardite et de péritonite généralisée.

La vaginale ouverte le 30 laisse écouler une abondante quantité de pus chargé de pneumocoques.

Il reçoit, du 28 au 30, 200 c. c. de sérum sans succès et meurt le 1er mai au matin.

A l'autopsie on trouve pleurésie droite, péricardite pseudo-membraneuse; péritonite généralisée et vaginalite; méningite cérébro-spinale purulente. Cette dernière localisation ne s'était manifestée par aucun des signes ordinaires. Jusqu'au 30 avril le malade répondait aux questions qui lui étaient posées, et prenait dans le lit, sans grande difficulté, toutes les positions qu'on lui indiquait.

En somme, de nos 4 malades, 3 ont certainement bénéficié des injections de sérum. Chez le 1er la crise est survenue le 7e jour et les symptômes graves du côté des sinus ont été promptement supprimés.

Chez le 2e, la crise est survenue seulement le 9e jour, mais la gravité des symptômes que présentait le malade, et que nous avons vus maintes fois suivis de terminaison fatale chez les noirs qui, en général, réagissent très peu, permet de supposer que là non plus le sérum n'a pas été inutile.

Le 3e malade a présenté des signes très nets d'envahissement des méninges. La maladie prise au début a évolué vers la guérison avec une rapidité telle que là encore les injections pratiquées paraissent avoir exercé une influence très heureuse.

L'échec que nous avons eu avec notre 4e malade s'explique facilement par la multiplicité et la gravité des lésions et n'est pas de nature à décourager.

Nous aurions désiré donner d'une façon moins écourtée les observations de ces quatre malades, mais les feuilles cliniques ayant été perdues, nous avons dû nous contenter des renseignements que nous avions consignés dans nos notes malheureusement trop brèves.

Que mes deux camarades et amis, les Drs Clouard et Portel me permettent, en terminant, de leur adresser mes remerciements pour leur obligeance à me faciliter les moyens de recueillir une grande partie de ces notes.

ÉTUDE SUR L'IMMUNITÉ VIS-A-VIS DES COMPOSÉS ARSÉNICAUX

DEUXIÈME MÉMOIRE

DU ROLE DES LEUCOCYTES DANS L'INTOXICATION
PAR UN COMPOSÉ ARSÉNICAL SOLUBLE

Par le Dr BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Plus on avance dans l'étude des maladies microbiennes, plus on voit la part importante qui y revient aux produits microbiens solubles.

Les recherches de M. Metchnikoff et de ses nombreux élèves ont mis en évidence les moyens à l'aide desquels l'organisme parvient à se débarrasser des microbes.

Nous nous sommes proposé de chercher comment l'organisme se défend contre l'action des toxines, par quels phénomènes cet acte se traduit et quelles en sont les conséquences immédiates.

Les anciennes recherches de M. Metchnikoff sur la pneumo-entérite des porcs, puis sur le choléra, les recherches récentes relatives à la toxine tétanique faisaient prévoir que l'appareil phagocytaire réagit aussi vis-à-vis de toxines microbiennes libres : mais la preuve directe manquait, et cela parce que les toxines étant à la fois invisibles au microscope et inaccessibles au chimiste, leur sort ne pouvait guère être suivi dans l'organisme; quant aux injections d'extraits d'organes, faites pour déceler la présence des toxines, on conviendra que ce procédé est très imparfait : encore n'est-il pas toujours applicable.

L'étude des réactions leucocytaires vis-à-vis des toxines, comme cela a été fait par nous vis-à-vis de la toxine diphtérique [1], faisait nettement entrevoir des rapports intimes entre les toxines et les leucocytes, sans permettre cependant d'affirmer leur caractère phagocytaire.

1. Ces *Annales*. Mai 1898.

Pour pénétrer plus avant dans l'intimité de ces rapports, le moyen le plus indiqué dans l'état actuel de nos connaissances était de renoncer aux toxines, tout en s'adressant à des substances qui leur ressemblent le plus sans en présenter les inconvénients. Le choix est tombé sur un composé soluble d'arsenic — acide arsénieux en solution alcaline — qui, outre sa toxicité élevée et d'autres points de ressemblance sur lesquels nous reviendrons, présente l'avantage d'être d'une sensibilité précieuse au point de vue chimique.

L'intérêt médico-légal attaché à l'étude des composés arsénicaux a fait que, de tous les poisons, l'arsenic est certainement celui qui possède la plus riche bibliographie : afin de restreindre autant que possible l'étendue de ce mémoire, nous renvoyons le lecteur à l'excellent livre[1] de Ogier, où se trouve résumée toute l'histoire de l'arsenic.

Nous allons nous occuper ici seulement de deux questions : l'une porte sur les réactions leucocytaires dans les différentes formes d'intoxication arsénicale : l'autre, sur la faculté qu'ont les globules blancs d'englober ou plutôt d'absorber l'arsenic injecté à l'état soluble.

*
* *

§ I. — Injectons à un lapin ou à un cobaye une dose d'acide arsénieux[2] déterminant la mort *en moins de 24 heures*.

Que l'animal meure au bout de 2 heures ou qu'il meure au bout de 20 heures, le tableau de l'intoxication au point de vue leucocytaire est sensiblement le même. La différence dans ces cas se réduit à ceci : plus la dose est forte, plus rapidement arrive le stade hypoleucocytaire, et ce stade a des caractères d'autant plus tranchés que la mort arrive plus rapidement.

Pour donner une idée des phénomènes leucocytaires à la suite d'une dose tuant en moins de 24 heures, rapportons l'histoire d'un lapin choisi au hasard parmi les nombreux lapins et cobayes examinés dans les mêmes conditions.

Lapin de 1,920 grammes a présenté avant l'injection :

1. *Traité de toxicologie chimique*, 1899, Paris.
2. Nous nous sommes servi, au cours de toutes nos recherches, de la solution d'acide arsénieux au millième (1/1000), additionnée de poids égal de K_2CO_3.

	Leucocytes.	Mononucl. 0/0	Polynucl. 0/0
à 9 h.	12.800	68	32
à 9 h. 20 il reçoit sous la peau 17 c. c. d'acide arsénieux à 1 0/00.			
à 11 h. 30	3.600	90	10
à 2 h. 30	1.000	95	5
à 4 h. 30	700	95	5
à 6 h. 30	2.000	93	7
à 9 h.	2.400	94	6

Il est trouvé mort le lendemain matin.

Nous nous bornons à ce seul exemple pour ne pas tomber dans les redites, car tous les animaux ayant subi le même genre d'intoxication réagissent, à quelques centaines de leucocytes près, d'une façon identique[1] : c'est dire que, généralement, une ou deux heures après l'injection, le sang présente une hypoleucocytose se traduisant à la fois par une très forte diminution globale des leucocytes et par l'abaissement des polynucléaires qui, de 35 0/0 (moyenne normale), tombent à 10 0/0 — 5 0/0. Quant aux mononucléaires, qui font presque seuls les frais de l'hypoleucocytose, ils sont en majeure partie constitués par de petits lymphocytes.

En d'autres termes, l'intoxication rapide se caractérise par une chimiotaxie négative portant sur les éléments phagocytaires, polynucléaires et gros mononucléaires, laquelle chimiotaxie persiste jusqu'à la mort.

* * *

§ 2. — Quand l'animal reçoit une forte dose, mais inférieure à la dose mortelle, il réagit tout autrement, comme en témoigne l'exemple suivant, pris également parmi les nombreux cas semblables enregistrés dans notre cahier d'expériences.

Lapin de 2.000 grammes reçoit, le 31 octobre, à 6 heures du soir, 10 c. c. d'acide arsénieux.

	Leucocytes.	Mononucl. 0/0.	Polynucl. 0/0.
Avant l'injection,	9.000	66	34
1 nov. à 10 h.	11.200	38	62
à 3 h.	19.000	30	70
2 nov. à 10 h.	18.000	33	67

1. Nous insistons particulièrement sur ce fait, car à propos de notre étude sur les réactions leucocytaires vis-à-vis de la toxine diphtérique, bien que nous ayons souligné que tous nos animaux réagissaient de la même façon vis-à-vis d'une dose déterminée de toxine, on nous a reproché d'avoir tiré nos conclusions d'un *seul* cas.

	Leucocytes.	Mononucl. 0/0.	Polynucl. 0/0.
2 nov. à 4 h.	20.000	30	70
3 nov. à 4 h.	9.300	50	50
4 nov. à 10 h.	11.600	50	50
5 nov. à 6 h.	16.000	50	50
6 nov. à 6 h.	7.000	60	40

Les jours suivants le sang avait la composition normale.

Il résulte de ces chiffres que, lorsque l'animal survit au poison injecté, les réactions leucocytaires sont diamétralement opposées à celles qui ont lieu dans l'intoxication mortelle.

Tandis que dans le cas précédemment examiné c'était l'hypoleucocytose qui dominait la situation, dans le cas présent c'est juste le contraire : nous constatons non seulement une augmentation globale des leucocytes, mais en plus un accroissement du taux des polynucléaires, qui de 34 0/0 s'élève à certains moments à 70 0/0.

Remarquons que l'exemple choisi n'est qu'un cas d'intoxication moyenne : déjà, au bout de deux jours, l'animal était complètement rétabli. Mais lorsque la dose est près de la mortelle et que l'animal, très éprouvé par l'inoculation, met 5 à 6 jours à se rétablir, le jeu des leucocytes atteint le plus haut degré de son activité, et à certains jours, surtout au début, il est donné de constater 30,000 leucocytes au lieu de 10,000 qui est la moyenne ordinaire, et avec cela 90 0/0 de polynucléaires au lieu de 35 0/0 à l'état normal.

Cette hyperleucocytose ne s'installe pas d'emblée après l'injection; elle est précédée d'un stade hypoleucocytaire dont la durée est en raison directe de la dose injectée, et dépasse rarement 10-12 heures, mais elle diffère essentiellement de l'hypoleucocytose à laquelle on assiste dans l'intoxication rapidement mortelle.

Cette différence est quantitative et qualitative : tout en diminuant, le chiffre total des leucocytes ne tombe jamais au degré observé dans les cas mortels; il se maintient généralement dans les environs de 4-5,000 par millimètre cube; en plus, et c'est là son caractère distinctif de première importance, au lieu d'être constituée par des lymphocytes, comme dans le cas précédent, l'hypoleucocytose de l'animal devant guérir se caractérise par une élévation des polynucléaires relativement à l'état normal;

c'est là même un signe précoce qui permet de prévoir dès les premières heures, sinon la guérison définitive de l'animal, du moins une survie, ne fût-ce que d'un ou plusieurs jours.

Ainsi, en cas de dose non mortelle, chimiotaxie négative rapidement remplacée par la chimiotaxie positive, toutes les deux phases ayant des caractères bien typiques.

*
* *

§ 3. — Nous connaissons maintenant les effets leucocytaires déterminés d'un côté par les doses tuant en moins de 24 heures, et d'autre côté par celles ne tuant pas du tout.

C'est le moment de parler des doses intermédiaires qui, tout en étant mortelles, ne tuent qu'au bout de quelques jours.

Comme il était à prévoir, les réactions leucocytaires, dans ce cas, empruntent certains caractères aux deux cas extrêmes que nous venons d'étudier.

Un cobaye de 400 gr. reçoit à 10 h. 30 le 11 août 3,5 c. c. arsénieux à 1 0/00.

	Leucocytes.	Mononucl. 0/0	Polynucl. 0/0
Avant l'injection :	7.500	66	34
à 11 h. 40	1.400	76	24
à 5 h.	2.000	25	75
12 août à 10 h.	17.000	16	84
à 4 h. 20	9.000	25	75
13 août à 10 h. 20	7.000	27	73
à 4 h.	8.500	25	75
14 août à 10 h.	3.000	45	55
à 5 h.	1.800	50	50
15 août à 10 h.	600	90	10
à 6 h.	1.000	90	10

L'animal est mort à 9 h. du soir.

La mort est donc survenue le 5e jour après l'injection. Nous voyons que, pendant les trois premiers jours, les choses se passent comme si l'animal devait guérir ; en effet, nous constatons d'abord une hypoleucocytose initiale, ayant le caractère de celle des cas favorables, c'est-à-dire, une hypoleucocytose se formant en majeure partie par des polynucléaires ; ensuite, nous constatons une hyperleucocytose qui se traduit surtout par une augmentation considérable du taux des polynucléaires (jusqu'à 84 0/0).

Remarquons seulement que, malgré ce tableau rassurant en apparence, l'observateur, pour peu qu'il soit habitué à ce

genre de recherches, se gardera bien de promettre une guérison, et voici pourquoi.

Déjà, en voyant une forte hypoleucocytose (2,000) persister encore au bout de sept heures après l'injection, il fera des réserves sur l'issue finale: le pronostic s'aggrave quand le lendemain et le surlendemain (le 12 et le 13 août), malgré la forte dose d'arsenic, on constate une faible réaction au point de vue des chiffres totaux des leucocytes (2,000; 7,000; 8,500).

Le doute n'est plus permis dès le commencement du 14 août, quand il se produit un revirement brusque dans les mouvements leucocytaires, quand leur nombre se met à baisser de plus en plus, les polynucléaires à devenir de plus en plus rares, et les petits lymphocytes à se mettre de plus en plus en relief. On retrouve finalement le tableau que nous avons appris à connaître en étudiant l'intoxication à marche rapide — c'est-à-dire l'hypoleucocytose avec la mort à brève échéance.

*
* *

Quelle que soit la dose injectée, on peut toujours ramener les réactions leucocytaires à un des trois types qui viennent d'être décrits.

On peut les résumer ainsi : la mort survient-elle en moins de 24 heures, l'animal réagit en hypoleucocytose; la survie est-elle définitive, il réagit en hyperleucocytose; enfin la survie n'est-elle que de quelques jours, l'animal réagit d'abord en hyperleucocytose, puis en hypoleucocytose mortelle.

Tels sont les faits réduits à leur expression la plus simple.

Pour ne pas quitter le terrain expérimental, nous nous bornons à les signaler sans les faire suivre d'aucune interprétation.

*
* *

§ 4. — Jusqu'ici nous avons fait varier la dose du poison; faisons maintenant varier l'animal d'expérience ; au lieu d'expérimenter sur un animal neuf, prenons un animal accoutumé.

Ici une remarque s'impose. L'accoutumance à l'arsenic existe-t-elle?

Les expérimentateurs qui se sont occupés de l'arsénicisme sont unanimes à reconnaître qu'en ce qui concerne les animaux

du laboratoire, il n'y a point d'accoutumance, et même que les animaux, après plusieurs injections, deviennent plus sensibles et meurent souvent d'une dose d'arsenic inférieure à la dos emortelle.

Ceci est exact pour les conditions dans lesquelles se sont placés les auteurs ; cela n'empêche pas que l'accoutumance à l'arsenic existe, et l'on peut la mettre en évidence même en injectant simplement plusieurs fois à l'animal des doses considérables, mais non mortelles d'arsenic ; de cette façon on peut parvenir, très péniblement il est vrai, à faire supporter une dose tuant le témoin en 48 heures.

Mais il existe un procédé beaucoup plus expéditif qui conduit au même résultat. Pour ne pas faire dévier le sujet du présent travail, nous en donnerons la description dans le prochain mémoire, où nous traiterons de l'immunisation en général : pour le moment, disons seulement qu'il est possible de préparer l'animal de façon qu'il puisse supporter la dose mortelle pour le témoin dans les 48 heures qui suivent l'injection.

Comment se comportent les globules blancs dans ces cas ?

L'expérience montre qu'ils se comportent exactement comme s'il s'agissait d'un animal neuf, soumis à une dose non mortelle d'arsenic.

Tandis que le témoin du même poids réagit ou en hypoleucocytose seule ou en hyperleucocytose passagère suivie d'hypoleucocytose, selon la quantité d'arsenic, le lapin préparé réagit tout différemment : après une hypoleucocytose ayant le caractère de celle qu'on observe dans le cas de dose non mortelle (§ 2) vient s'établir un stade hyperleucocytaire très prononcé qui dure plusieurs jours ; puis tout rentre dans l'ordre, le sang reprend sa constitution normale.

Voici des chiffres traduisant cette réaction d'un animal préparé lors d'une injection d'une dose mortelle ; le caractère de cette réaction est calqué sur celui étudié déjà (§ 2) dans le cas de survie définitive.

Lapin de 2,020 grammes reçoit le 4 novembre à 3 h. 20, 14 c. c. de la solution d'acide arsénieux à 1/1000 qui a tué le témoin en 36 heures.

Avant l'injection.	Leucocytes.	Mononucl. 0/0.	Polynucl. 0/0.
4 nov. à 2 h. 20	10.400	67	33
à 4 h. 20	4.800	74	26
à 5 h. 50	4.500	25	75

Avant l'injection.	Leucocytes.	Mononucl. 0/0.	Polynucl. 0/0.
5 nov. à 9 h.	22.400	18	82
à 2 h.	12.600	16	84
à 6 h.	16.500	21	79
6 nov. à 9 h.	19.600	19	81
à 2 h. 40	13.300	30	70
à 7 h.	14.000	25	75
7 nov. à 9 h.	12.800	45	55
à 2 h.	16.700	36	64
8 nov. à midi	11.000	50	50

Les jours suivants la composition du sang est revenue à l'état normal.

Ce fait que deux animaux — un neuf, l'autre accoutumé — réagissent différemment vis-à-vis d'une même dose d'arsenic, nous fait conclure que le jeu des leucocytes ne relève qu'indirectement de la quantité du poison, mais qu'en réalité il est commandé par la résistance que l'animal oppose au poison. De plus, la nature des réactions leucocytaires chez le lapin neuf et l'accoutumé nous apprend que la résistance de l'animal est d'autant plus efficace que les leucocytes, et en particulier, les polynucléaires sont plus nombreux dans le sang et qu'ils y séjournent plus longtemps.

*
* *

C'est là une conclusion qui découle directement des faits; mais loin de satisfaire l'esprit, elle soulève au contraire de nouvelles questions. Comment, en effet, l'animal parvient-il à résister au poison par le seul fait de la présence dans le sang de nombreux leucocytes?

Peut-être, avons-nous pensé, les leucocytes, mobilisés en si grand nombre, ne se contentent-ils pas d'un rôle purement passif, et après avoir répondu à l'appel chimiotactique de l'arsenic, contractent-ils avec ce dernier des rapports favorables à la survie de l'animal.

Cette idée devait naturellement venir à l'esprit, surtout après l'étude que nous avons faite sur le trisulfure d'arsenic[1], mais autant il était facile d'en faire la démonstration pour une poudre rouge brun et presque insoluble, autant il est difficile de le faire quand il s'agit d'une substance incolore et soluble. Le problème devient encore plus difficile si on tient compte de la toxicité

1. Ces *Annales*, Janvier 1899.

beaucoup plus élevée de l'arsénite de potasse comparativement au trisulfure, d'où la nécessité de travailler avec de très petites quantités de substance.

Toutes ces difficultés peuvent cependant être surmontées comme nous le verrons plus bas : disons d'ores et déjà que les expériences ont montré de la façon la plus nette que, dans le stade hyperleucocytaire, les globules blancs absorbent l'arsenic injecté à l'état soluble exactement comme nous les avons vus englober le trisulfure d'arsenic, comme nous les voyons journellement englober les microbes.

II

§ 1. — A défaut des réactions microchimiques permettant d'analyser chaque cellule isolément, nous nous sommes efforcés de réunir un grand nombre de leucocytes pouvant former une masse de matière, justiciable d'une analyse chimique macroscopique.

A cet effet, nous avons eu recours à deux procédés, tous les deux également bons : le premier consiste à déterminer chez les lapins une série d'abcès froids pendant qu'ils sont en traitement arsénical ; le second, à séparer du sang la couche leucocytaire par centrifugation pendant que l'animal traverse la phase hyperleucocytaire.

Entrons maintenant dans les détails.

En ce qui concerne le premier procédé qui est encore inédit, c'est M. Borrel, son auteur, qui nous a très obligeamment fourni toutes les indications nécessaires. Lorsqu'on injecte sous la peau des lapins des cultures mortes de tuberculose, et que l'on répète ces injections plusieurs fois à des intervalles de 8-10 jours, on obtient finalement des abcès se développant avec une rapidité surprenante, et atteignant les dimensions de grosses noix.

L'opération dure quelquefois deux mois, car les premiers abcès mettent longtemps à venir ; mais l'évolution des abcès intérieurs devient de plus en plus rapide à mesure que l'animal s'y habitue.

Pendant la formation de ces abcès, nous injections tous les 3-4 jours, sous la peau ou dans le sang, de petites quantités

d'acide arsénieux, de façon que l'animal en demeure toujours imprégné sans cependant présenter de l'intolérance.

Le contenu de l'abcès obtenu dans ces conditions révèle la présence de l'arsenic.

Cet arsenic est dû nécessairement aux éléments figurés, aux leucocytes dont est rempli l'abcès : ce dernier étant d'une consistance caséeuse épaisse, sans traces de liquide, il faut naturellement écarter l'idée du transport de l'arsenic par les humeurs. Cette dernière hypothèse devient d'autant plus insoutenable que le sang examiné en même temps, même à poids plus élevé, ne contient pas la moindre trace d'arsenic [1].

La quantité d'arsenic n'était pas dosable; cela est dû d'abord à la petitesse des doses injectées; puis, probablement, à l'état même des leucocytes du contenu de l'abcès; ceux-ci étaient pour la plupart déjà morts, ce qui, combiné à la durée de la formation de l'abcès, fera comprendre qu'une partie de l'arsenic absorbé par les leucocytes vivants pouvait bien abandonner les globules morts et être éliminée par les voies ordinaires.

Ceci explique pourquoi des grammes entiers de leucocytes ne donnent que fort peu d'arsenic ; mais le fait essentiel n'en reste pas moins bien établi, c'est qu'une masse déterminée de leucocytes contient de l'arsenic, tandis qu'une masse égale et même double du sang en est complètement dépourvue.

*
* *

§ 2. — Le second procédé auquel nous nous sommes adressé a l'avantage d'être circonscrit dans le temps, mais en revanche la masse leucocytaire qu'il fournit est inférieure à celle fournie par les abcès.

Trois ou quatre lapins ayant supporté la dose mortelle (les détails en seront exposés dans le chapitre sur l'immunisation) sont saignés à blanc 4 ou 5 jours après l'injection, au moment, par conséquent, où ils sortent de l'hyperleucocytose.

Afin de rendre le sang incoagulable, on leur injecte, quelques minutes avant la saignée, de l'extrait de sangsues ; par surcroît de précautions, le sang est recueilli dans un ballon contenant

1. Dans un cas, 8 grammes du contenu caséeux ont donné un anneau net d'arsenic métallique, tandis que 15 grammes du sang du même animal examiné en même temps n'en contenaient pas de traces.

au fond du citrate de soude (5 0/00). Dans ces conditions il reste longtemps incoagulable.

Après une centrifugation de deux heures on voit se former, entre le plasma jaune clair et les globules rouges occupant la partie inférieure du tube, une mince couche de leucocytes se présentant sous forme de pellicule blanche se détachant facilement des globules rouges sous-jacents.

Comme il est difficile d'isoler la couche leucocytaire seule sans que les globules rouges ou un peu de plasma ne soient aussi entraînés, ce qui d'ailleurs n'a pas d'importance, il nous est impossible d'évaluer le poids de la masse leucocytaire ainsi obtenue : elle ne doit pas dépasser un ou deux grammes au plus.

Après avoir retiré du sang centrifugé les leucocytes, on y prélève 15 à 20 grammes de plasma et autant de globules rouges.

Ces trois portions sont alors soumises à l'analyse chimique.

Avant d'exposer les détails de cette analyse, constatons que, répétée plusieurs fois, cette expérience nous a permis de confirmer le fait que nous avons vu déjà en nous servant du premier procédé : *bien que la masse du plasma et des globules rouges fût beaucoup supérieure à celle des leucocytes, c'est dans cette dernière uniquement que nous avons trouvé de l'arsenic*; comme dans le premier cas, ici aussi l'arsenic obtenu n'était pas dosable[1].

Dans la longue série des lapins que nous avons soumis à cette expérience, il s'en trouva quelques-uns dont les leucocytes ne renfermaient pas d'arsenic, pas plus d'ailleurs que leur plasma ou les globules rouges. Quelle en est la cause, nous l'ignorons ; remarquons seulement, à titre d'indication, que, dans un cas pareil où nous avons examiné le sérum, nous l'avons trouvé dépourvu des propriétés curatives propres en général au sérum des lapins mis dans les mêmes conditions ; nous reviendrons sur ce sujet en parlant du sérum des animaux immunisés.

* * *

§ 3. — Ainsi, des expériences qui viennent d'être décrites, il ressort que, lorsque l'animal est préparé de façon à survivre à la

1. Tout récemment M. Stassano a fait une constatation analogue pour le mercure; après avoir injecté à un chien du sublimé, il a vu que seuls les leucocytes en contiennent à l'exclusion d'autres parties du sang, à poids égaux.

dose mortelle, ses leucocytes contiennent de l'arsenic ; lorsqu'il n'est pas préparé et meurt en 24 ou 48 heures, son sang et *a fortiori* ses leucocytes ne contiennent pas d'arsenic après la mort, comme nous le savons, entre autres, par le travail de G. Brouardel[1].

En raison des réactions leucocytaires ayant lieu dans l'un et l'autre cas, il faut conclure que la présence de l'arsenic dans les leucocytes est liée au seul stade d'hyperleucocytose, suivie de guérison de l'animal.

Dès lors, les réactions leucocytaires que nous avons étudiées au commencement de ce travail nous apparaissent sous un jour nouveau. Nous avons vu que d'une façon générale la mort se traduit par une hypoleucocytose avec absence presque complète des éléments phagocytaires; la vie, au contraire, se caractérisait par une chimiotaxie positive qui porte dès les premières heures sur les polynucléaires : dans ce dernier cas, les leucocytes accoutumés ne fuient pas devant le poison ; tout au contraire, attirés positivement, ils englobent l'arsenic et l'empêchent ainsi de diffuser dans l'organisme, d'où survie de l'animal.

En d'autres termes, la vie est corrélative de la phagocytose du poison, tandis que l'absence de la phagocytose est corrélative de la mort.

Cette formule, toute théorique qu'elle paraisse être, n'est que l'aboutissant logique des faits exposés.

On arrive à la même conclusion par une voie d'ordre tout à fait différent, mais aussi expérimentale.

Il est hors de doute que les composés arsénicaux sont des poisons du système nerveux par excellence, et si l'animal s'en intoxique, c'est que ses cellules nerveuses sont mises en contact avec l'arsenic, en un mot fixent l'arsenic.

Il s'ensuit donc que la dose minima mortelle pour un lapin, par exemple, est celle qui le tue, étant mise en contact direct avec ses cellules les plus sensibles.

Il se trouve que cette dose minima injectée dans le cerveau doit être au moins centuplée pour déterminer le même effet en injection sous-cutanée.

Cela prouve que, lors de l'injection sous-cutanée, la majeure partie de l'arsenic reste en route. C'est évidemment dans le sang

1. De l'arsénicisme. *Thèse de Paris*, 1897.

surtout, où l'arsenic arrive aussitôt après l'injection, et d'où il disparaît dans les organes en totalité quand rien ne s'y oppose, que réside l'agent empêchant le transport du poison au système nerveux central ; et parmi les éléments du sang, *a priori*, il n'y a que les globules blancs qui soient capables d'intercepter en route le poison.

Cette interception de l'arsenic, nous venons de le voir, n'est autre que l'acte phagocytaire auquel l'animal doit d'avoir survécu.

Avec le concours de M. Borrel, nous avons déterminé que le lapin inoculé dans le cerveau meurt de la dose 100 fois inférieure à celle qui tue en injection sous la peau ; ainsi, pour tuer un lapin de deux kilogrammes, il a suffi d'injecter dans le cerveau 1/10 c. c. d'une solution qui tuerait le même lapin dans le même espace de temps (48 heures) en quantité de 10 c. c. ; ajoutons que les phénomènes d'intoxication (diarrhée, dégénérescence graisseuse des organes et autres) sont exactement les mêmes dans les deux cas.

*
* *

§ 4. — Pour compléter cette étude, il nous reste à décrire succinctement le procédé opératoire ayant servi à la recherche de l'arsenic dans les différentes portions du sang, aussi bien que dans les organes, au cours des expériences exposées dans le premier mémoire.

La substance à examiner, si c'est un organe, est coupée en morceaux aussi menus que possible, additionnée d'eau et réduite à la consistance d'une bouillie peu épaisse. On y ajoute du chlorate de potasse cristallisé, en quantité égale environ au huitième du poids des matières primitives : le tout est mis dans un ballon dans lequel on fait arriver l'acide chlorhydrique à l'état gazeux. Ce dernier, à mesure qu'il arrive dans le ballon, s'y dissout jusqu'au moment où l'acide ainsi formé acquiert une concentration suffisante pour réagir sur le chlorate de potasse. Les gaz chlorés qui résultent de la décomposition du chlorate agissent donc à l'état naissant sur la masse contenue dans le ballon, et à la fin de l'opération, si elle est bien conduite, on obtient un liquide jaune clair, au milieu duquel nagent des matières grasses échappées à la destruction ; ces dernières, après des lavages répétés, sont séparées du liquide qui désormais fait seul l'objet des traitements ultérieurs.

Comme il contient un excès de chlore, on l'en débarrasse au moyen d'un courant d'acide sulfureux gazeux, qui a en plus ce précieux avantage de réduire l'acide arsénique à l'état d'acide arsénieux — ce qui rend plus rapide la précipitation ultérieure par l'hydrogène sulfuré.

Le liquide ainsi traité contient maintenant un excès d'acide sulfureux que l'on chasse par l'évaporation au bain-marie pendant 15-20 minutes environ ; c'est alors qu'on fait passer dans le liquide, encore chaud et privé d'odeur d'acide sulfureux, un courant d'hydrogène sulfuré pendant 12 heures environ.

Le précipité qui se forme au bout de ce temps, composé de soufre, des matières organiques soufrées et du sulfure d'arsenic (s'il y en a), et recueilli sur un filtre, est traité par l'ammoniaque qui dissout le trisulfure d'arsenic et en partie le soufre.

La solution ammoniacale filtrée est évaporée au bain-marie, et le résidu sec est oxydé par l'acide nitrique et chauffé de nouveau au bain-marie jusqu'à siccité.

Il s'agit maintenant de chasser les dernières traces d'acide azotique qui est fort nuisible pour l'opération ultérieure ; on ajoute à cet effet de l'acide sulfurique concentré en présence duquel on chauffe le liquide d'abord au bain-marie, puis au bain de sable jusqu'à l'apparition des vapeurs blanches d'acide sulfurique.

La solution ainsi préparée et étendue d'une quantité considérable d'eau est prête à être mise dans l'appareil de Marsh, sur lequel nous croyons inutile d'insister.

*
* *

Avant de résumer les points isolés de ce travail, il ne sera pas peut-être inutile de mettre en relief l'enseignement d'ordre général qui se dégage de l'ensemble des faits exposés dans la première partie.

Nous savons que M. Buchner admet bien la chimiotaxie des leucocytes, mais la considère comme indissolublement liée à la présence des microbes dégénérés ou des substances protéiques en général, et comme indépendante de la réaction de l'organisme souffrant.

On voit d'ici la divergence fondamentale qui sépare M. Buchner des partisans de la phagocytose.

Nos expériences ont montré que point n'est besoin de faire intervenir les protéines pour déterminer une chimiotaxie positive : les phénomènes n'ont effectivement changé en rien, malgré le remplacement des protéines de M. Buchner par une substance aussi peu protéique que l'acide arsénieux.

Ce ne sont donc pas les protéines, ni en général les poisons qui envahissent l'organisme, qui commandent la chimiotaxie, mais c'est l'organisme lui-même qui règle les mouvements leucocytaires selon la réaction qu'il oppose au poison, que celui-ci soit d'origine protéique ou qu'il soit de nature minérale ; la chimiotaxie positive est toujours l'indice d'un acte de défense contre le danger d'intoxication ; ceci a été surabondamment prouvé par l'étude des détails que nous allons maintenant résumer.

* * *

Nous avons vu que les réactions des leucocytes varient essentiellement suivant la résistance que présentent les animaux : elles sont donc variables selon la dose du poison et selon que les animaux sont neufs ou accoutumés au poison.

Ces réactions portent non seulement sur la quantité des leucocytes, mais encore sur leur qualité.

Quelle que soit la dose d'arsenic, on observe toujours après l'injection un stade d'hypoleucocytose, qui tantôt persiste jusqu'à la mort, tantôt est remplacée par l'hyperleucocytose.

Dans l'intoxication par l'acide arsénieux, il y a lieu de distinguer trois types de réactions leucocytaires : *a*) l'animal meurt en moins de 24 heures; *b*) l'animal survit définitivement ; *c*) la survie ne dure que quelques jours.

a) Dans l'intoxication du premier type, déjà une heure après l'injection il s'établit une hypoleucocytose nette.

Les chiffres des leucocytes diminuent progressivement et d'autant plus rapidement que la dose a été plus forte.

Au point de vue qualitatif, cette hypoleucocytose se traduit par une diminution caractéristique des polynucléaires : à l'état normal le rapport entre les poly- et mononucléaires est chez le lapin de 1 : 2; ici il est réduit à 1 : 9 et même jusqu'à 1 : 19.

La majeure partie des leucocytes dans ce stade sont des petits lymphocytes.

b) L'animal survit définitivement. Ici deux cas peuvent se

présenter : ou l'animal a reçu une dose non mortelle, ou bien il a reçu une dose mortelle, mais la supporte à la faveur d'une préparation préalable.

Dans un cas comme dans l'autre, l'injection est suivie d'hypoleucocytose, dont le degré et la durée sont en rapport avec la dose et la résistance individuelle de l'animal.

Cette phase, pendant laquelle l'animal est visiblement malade, ne tarde pas à céder place à l'hyperleucocytose, qui dure plusieurs jours et coïncide avec le rétablissement de l'animal.

La réaction porte ici aussi non seulement sur le nombre absolu, mais encore sur la qualité des leucocytes.

Déjà au stade d'hypoleucocytose on observe une tendance des polynucléaires à affluer de plus en plus dans le sang, et ils y deviennent extrêmement nombreux dès que l'hyperleucocytose s'installe franchement.

c) Dans le cas où l'animal n'a qu'une survie passagère, on observe trois stades successifs : une hypoleucocytose accentuée d'abord, une hyperleucocytose avortée ensuite, et finalement une hypoleucocytose mortelle du premier type.

L'analyse chimique des leucocytes dans les différents cas montre que ceux-ci contiennent l'arsenic seulement dans le stade hyperleucocytaire, accompagné de survie.

On n'en trouve jamais après la mort survenue 24 ou 48 heures après l'injection, c'est-à-dire au stade hypoleucocytaire.

L'hyperleucocytose ou la chimiotaxie positive est donc accompagnée d'englobement ou de l'absorption du poison, et de la survie de l'animal.

Il existe donc, à l'égard d'un produit toxique soluble, une phagocytose ayant exactement le même caractère que pour les microbes ou poisons insolubles.

*
* *

Dans le prochain mémoire, nous étudierons les faits consécutifs au séjour de l'arsenic dans l'intérieur des leucocytes ; nous traiterons notamment des propriétés préventives et antitoxiques du sérum des animaux immunisés.

MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS

Pr. n° 145.

Vient de paraître :

MANUEL PRATIQUE
DE
L'ANALYSE DES ALCOOLS
ET DES SPIRITUEUX

PAR

Charles GIRARD
DIRECTEUR DU LABORATOIRE MUNICIPAL
DE PARIS

Lucien CUNIASSE
CHIMISTE EXPERT
DE LA VILLE DE PARIS

Un volume in-8° avec figures dans le texte, relié toile. 7 fr.

AVERTISSEMENT DES AUTEURS

Le nouveau manuel pratique de l'analyse des alcools et des spiritueux, que nous présentons aujourd'hui au public, forme un recueil dans lequel les nombreux procédés analytiques qui intéressent les produits alcooliques se trouvent condensés sous une forme brève et exacte, dans le but d'éviter les recherches au chimiste praticien.

Parmi les appareils et les méthodes de dosages que nous décrivons, un grand nombre ont été créés par nos devanciers, par nos collègues et par nous, au laboratoire municipal de Paris, sous la direction de MM. Ch. Girard, Dupré et Pabst. Les autres ont été vérifiés et pratiquement essayés, comparativement à nos procédés et aux méthodes anciennement connues.

Au début de ce livre, nous nous efforçons de divulguer les secrets de la dégustation ; puis nous passons rapidement en revue les différentes méthodes et les appareils nombreux proposés pour

le dosage direct de l'alcool, en insistant sur ceux qui peuvent être dignes d'un certain crédit. La méthode de distillation est décrite avec soin ; nous indiquons les précautions à prendre, afin d'éviter les causes d'erreurs et d'unifier les résultats obtenus. De nombreuses tables très complètes accompagnent ces différents chapitres.

Les tables de comparaison, entre les étalons français et les alcoomètres étrangers usités dans les transactions commerciales, ont été vérifiées et sont exactement reproduites.

Les méthodes d'analyse des spiritueux sont exposées de façon à pouvoir être mises en œuvre pratiquement et presque sans raisonnement. Le procédé de dosage des différents sucres, qui présente un grand intérêt au sujet de la recherche des additions de glucose dans les liqueurs, est traité d'une façon suffisamment complète pour la pratique.

Les différentes méthodes d'analyse de l'alcool et de recherche de ses impuretés, ainsi que celle qui a été proposée, il y a quelques années, par M. Ch. Girard et ses collaborateurs, sont données avec les dernières modifications qui ont pu leur être apportées.

Des tables et des courbes inédites, dont la rigoureuse exactitude a été vérifiée par de nombreux essais, accompagnent nos méthodes afin de simplifier les calculs et d'éviter l'application des formules.

Les propriétés des corps organiques, dont il peut être question dans le texte, se trouvent condensées sous forme de tableau.

La partie qui traite de l'essai des alcools dénaturés et des méthylènes est particulièrement complète. Les méthodes sont exposées, telles qu'elles se pratiquent dans les laboratoires officiels, et avec un ensemble de détails opératoires qui en rendent l'application facile et immédiate.

Nous publions une bibliographie, aussi complète que possible, de l'alcool et de l'alcoolisme, et nous reproduisons textuellement les circulaires émises récemment par la Direction générale des contributions indirectes pour la réglementation fiscale des alcools et des spiritueux. Enfin, des tableaux représentant les résultats de l'analyse d'un grand nombre d'échantillons de spiritueux divers terminent cet ouvrage, et forment des documents nouveaux, utiles à consulter, ou susceptibles de servir de termes de comparaison.

Nous espérons que ce livre sera favorablement accueilli par nos nombreux collègues, par toutes les personnes qui s'intéressent à la question de l'alcool et de l'alcoolisme et qu'il viendra s'ajouter aux collections des aide-mémoire pratiques qui forment la bibliothèque de leurs laboratoires.

A LA MÊME LIBRAIRIE

La rectification de l'alcool, par Ernest SOREL, ancien ingénieur des manufactures de l'État, professeur au Conservatoire des Arts et Métiers. 1 vol. petit in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire* . . . . 2 fr. 50

La Distillation, par Ernest SOREL, 1 vol. in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire* . . . . 2 fr. 50

Les Appareils de distillation et de rectification, par Emile BARBET, ingénieur des Arts et Manufactures. 1 vol. grand in-8°, avec figures . . . . 5 fr.

Traité de la distillation des produits agricoles et industriels, par MM. J. FRITSH, secrétaire de la rédaction du journal la *Distillerie française*, et E. GUILLEMIN, chimiste. 1 vol. in-8°, avec 80 figures dans le texte . . . . 8 fr.

La Fabrication de l'alcool, par M. J. Paul ROUX. Brochures in-8° : *La Production du rhum :* 3 fr. *Distillation des grains :* 5 fr. *Distillation du cidre :* 1 fr. 50. — *Distillation de la betterave :* 3 fr. — *Distillation des mélasses :* 3 fr. — *Distillation des vins :* 1 fr. 50.

Fabrication des eaux-de-vie, par Louis JACQUET, ingénieur des Arts et Manufactures. 1 vol. petit in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire* . . . 2 fr. 50

Examen sommaire des boissons falsifiées, par A. HÉBERT, préparateur à la Faculté de médecine. 1 vol. petit in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire* . . . . 2 fr. 50

Examen des aliments suspects, par H. POLIN et H. LABIT, médecins-majors de l'armée. 1 vol. petit in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire*. . . 2 fr. 50

Analyse des vins, par le Dr L. MAGNIER DE LA SOURCE, expert chimiste. 1 vol. petit in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire* . . . . 2 fr. 50

Manuel de vinification, par L. ROUGIER, 3e édition corrigée et considérablement augmentée. 1 vol. in-12 avec 45 figures . . . . 4 fr.

Les Vins de luxe. *Manuel pratique pour la préparation des vins de liqueurs et des vins mousseux*, par Victor SÉBASTIAN, chimiste œnologue, délégué du Ministère de l'Agriculture, avec une préface de M. FERNBACH, docteur ès sciences. 1 vol. in-8° . . . . 3 fr. 50

Le Laboratoire du Brasseur, par M. Louis MARX, malteur à Marseille. *Ouvrage couronné par la Société d'Encouragement pour l'Industrie nationale*, 3e édition. 1 vol. in-8 . . . . 12 fr.

La Bière, par M. L. LINDET, professeur à l'Institut agronomique. 1 vol. in-8° de l'*Encyclopédie des Aide-Mémoire* . . . . 2 fr. 50

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette. — 15313.

LE

MÉCANISME DE L'AGGLUTINATION

Par le Dr Jules BORDET

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Le terme de « phénomène de l'agglutination » désigne habituellement ce fait que, sous l'influence du sérum spécifique, les microbes en suspension homogène dans un liquide tel que le bouillon ou la solution de NaCl à 0.7 0/0, se réunissent en flocons qui bientôt se déposent au fond du vase. Nous avons fait connaître en 1895 le premier exemple de ce phénomène, en montrant que les vibrions cholériques, délayés dans l'eau physiologique, s'immobilisent sous l'action d'une dose même faible de choléra-sérum, soit frais, soit chauffé préalablement à 55° ou 60°, et s'agglomèrent rapidement en amas flottants dans le liquide [1].

Ce fait de l'agglutination doit être considéré à des points de vue divers. En premier lieu, il doit être étudié en lui-même, indépendamment de sa signification physiologique. Envisagée sous cet aspect, l'étude de l'agglutination touche aux domaines de la physique et de la chimie. Elle rentre dans le cadre de la physiologie, lorsqu'elle cherche à préciser la signification du phénomène dans l'immunité, à savoir s'il joue un rôle dans la défense des organismes, à connaître les cellules capables de sécréter les substances qui se déversent dans le sérum et lui communiquent ses propriétés particulières.

C'est la question du mécanisme de l'agglutination qui fera le sujet du présent travail, et nous exposerons tout de suite les théories principales qui ont été proposées pour expliquer le phénomène. Nous ferons immédiatement une remarque, c'est que, pour satisfaire l'esprit, toute théorie de ce genre doit avoir

1. Les leucocytes et les propriétés actives du sérum chez les animaux vaccinés. Ces *Annales*, 1895, p. 496 et 498.

une portée suffisamment générale et ne point se borner à nous faire comprendre seulement l'agglutination subie par les microbes. Ceux-ci ne sont point en effet les seuls éléments susceptibles de s'agglomérer sous l'action d'un sérum. Nous avons pensé qu'il fallait rapprocher. de l'agglutination des microbes, celle que présentent les globules rouges sous l'influence d'un sérum provenant d'un animal d'espèce différente. Nous avons montré de plus qu'on pouvait. à la suite d'injections répétées de sang défibriné, obtenir un sérum spécifique doué, vis-à-vis des globules, de propriétés agglutinantes d'une grande énergie [1]. Toute explication doit donc, pour être acceptable, s'appliquer aussi bien à l'agglutination des globules qu'à celle des microbes, et même — comme le lecteur le verra plus loin — à celle que peuvent subir les particules de caséine en suspension dans le lait.

Cette observation faite, voici, par ordre chronologique, les diverses hypothèses qui ont été proposées :

1° *Hypothèse de Gruber.* — M. Gruber admet que l'agglutinine altère assez profondément la substance du microbe. Elle aurait pour effet de rendre visqueuse la membrane du microorganisme. Cet état visqueux spécial de leur couche périphérique amènerait l'adhérence des microbes les uns aux autres et expliquerait leur réunion en amas cohérents.

Cette conception permet bien de comprendre comment les microbes, dès qu'ils sont réunis, continuent à rester associés, mais elle n'indique guère pourquoi ils vont les uns vers les autres pour constituer des amas. Elle donne, dans l'explication du fait. une importance très grande, et *même tout à fait exclusive. à la structure organisée* des éléments susceptibles de s'agglutiner, sans supposer même qu'une part au moins du phénomène pourrait bien être sous l'empire de lois physiques. Comme elle repose entièrement sur l'existence d'un changement de la membrane, d'un gonflement accompagné de la production d'une matière adhésive. *elle n'explique pas l'agglutination de particules inorganisées*, de parcelles de matière minérale par exemple. Elle interdit donc tout rapprochement du phénomène de l'agglutination des microbes, avec celui de l'agrégation en flocons des précipités chimiques qui se produisent au sein d'un liquide.

1. Sur l'agglomération et la dissolution des globules rouges par le sérum. Ces *Annales*, 1898, p. 886.

2° *Hypothèse de Bordet*. — L'idée que nous nous faisions du phénomène en 1896 correspond à une tendance tout à fait opposée. Nous avions eu l'impression, en observant l'agglutination du vibrion cholérique sous l'influence du sérum actif, qu'il s'agissait d'une action où les microbes ne jouaient qu'un rôle passif, où leur vitalité n'entrait pas en jeu. L'immobilisation rapide qu'ils subissaient, l'existence de l'agglutination chez les globules rouges, éléments inertes, faisaient exclure le concours de la motilité. Le fait de la passivité des microbes nous fut démontré lorsque nous vîmes l'agglutination porter sur des microbes morts. D'autre part, l'hypothèse de M. Gruber suscitant certaines objections que nous rappelons plus loin, il nous parut que le fait de l'agglutination « rentrait plutôt dans le cadre de la physique moléculaire. Des influences légères suffisent à produire l'agrégation de précipités chimiques qui auparavant restaient disséminés dans une liqueur. Il est probable que le sérum, en agissant sur les microbes, *change les relations d'attraction moléculaire entre ces microbes et le liquide ambiant*[1]. »

Il est clair que cette interprétation ne comportait, pas plus que celle de M. Gruber, une explication vraiment intime du phénomène. Elle se bornait à faire un rapprochement entre les particules de nature très différente, — microbes, globules, précipités chimiques — qui peuvent se trouver en suspension dans les liquides et sont susceptibles de s'agréger en amas sous l'influence de certaines causes. A l'encontre de la conception de M. Gruber, cette manière de voir impliquait l'existence d'analogies dans le processus de l'agglutination, quelle que fût la nature des éléments qui la subissaient : elle admettait l'ingérence dans le phénomène, à titre prédominant, des lois de la physique.

Il faut cependant bien s'entendre. L'hypothèse signifie-t-elle que sous l'influence de l'agglutinine, *et dans toutes les phases du phénomène*, les microbes se comportent comme des particules de nature quelconque ? Évidemment non. Les agglutinines sont spécifiques : il n'y a pas non plus le moindre doute qu'elles n'agissent directement sur les microbes ; ceux-ci, en effet, ainsi qu'on a pu le voir dès les premières constatations du phénomène, s'immobilisent rapidement sous leur influence. Dans le premier temps du phénomène, l'action de l'agglutinine tient compte — il

1. Mode d'action des sérums préventifs. Ces *Annales*, avril 1896.

est à peine nécessaire d'y insister — de la nature biologique, de la constitution organisée spéciale de l'élément qu'elle impressionne : elle en tient tellement compte qu'elle porte sur certains microbes et pas sur d'autres. Mais il suffit, pour que, ultérieurement, les microbes atteints se réunissent en amas, que la substance active ait produit des modifications pouvant être légères, se bornant à changer les rapports d'adhésion moléculaire entre les microbes et le liquide. Dès lors, d'après l'hypothèse dont il s'agit, la nature biologique des éléments n'interviendrait plus ; les microbes s'agglutineraient désormais suivant des lois physiques applicables aussi à certaines particules non organisées qui s'agglomèrent — sans qu'il soit par conséquent nécessaire d'invoquer, pour expliquer la formation d'amas et l'adhérence des microbes, la présence d'une matière adhésive, de membranes collantes et visqueuses. L'hypothèse de M. Gruber exclut la participation des lois physiques ; la seconde les fait largement intervenir, au moins dans la phase du phénomène où les microbes encore épars, mais qui viennent d'être touchés par l'agglutinine, se réunissent pour présenter le tableau de l'agglutination.

Ces deux hypothèses formulées au début des études sur l'agglutination ne pouvaient alors s'étayer sur une base solide. Les faits manquaient. Une notion expérimentale importante fut apportée par M. Kraus.

M. Kraus [1] montra que si l'on mélange du sérum d'animaux vaccinés contre le vibrion cholérique, avec une culture filtrée et limpide de ce vibrion, il se produit un précipité au sein du liquide. Cette réaction est spécifique et ne se produit pas si. au lieu de choléra-sérum, on emploie un autre sérum quelconque. Le précipité formé possède la propriété de s'agglomérer bientôt en flocons dont l'aspect rappelle celui que présentent de véritables flocons de microbes agglutinés. M. Kraus montra que le même fait se constate encore pour d'autres microbes (fièvre typhoïde) et pour d'autres sérums.

Disons tout de suite que ces expériences semblaient *a priori* corroborer la seconde des deux hypothèses que nous venons de rappeler. Elles semblaient plaider nettement au contraire contre

1. Kraus, K. K. Gesellschaft der Aerzte in Wien, 30 avril 1897 ; et *Wiener klinische Wochenschr.* 12 August 1897, nº 32.

l'hypothèse de M. Gruber, laquelle reconnaît, pour cause unique à l'agglutination, une modification de structure de l'élément organisé. Elles montraient en effet qu'on peut obtenir des phénomènes de précipitation floconneuse rappelant beaucoup la véritable agglutination, en mélangeant à du sérum un liquide contenant non plus des microbes organisés, mais simplement des matériaux provenant de la désintégration microbienne. Le fait observé par M. Kraus paraissait donc tendre à faire écarter la théorie formulée par M. Gruber.

3° *Hypothèse de Nicolle* [1].— Telle n'a pas été cependant l'impression de M. Nicolle. M. Nicolle a confirmé les résultats obtenus par Kraus, et il admet que l'agglutinine précipite la substance agglutinable (ou agglutinée) des microbes [2]. Il admet encore que cette matière agglutinable, laquelle peut dans les vieilles cultures se diffuser dans le liquide ambiant, se trouve en abondance dans la membrane ou la couche périphérique des microbes, lorsque ceux-ci sont jeunes et en bon état.

Cette couche périphérique, renfermant la substance que l'agglutinine est capable d'atteindre et de précipiter, devient elle-même sensible à l'influence de l'agglutinine; sous l'action de cette dernière, cette couche externe du microbe « se gonfle, devient apparente, et se soude à la couche externe des individus voisins. Notre opinion sur la nature intime du phénomène de l'agglutination se rapproche donc tout à fait de celle émise par M. Gruber, et que, seul, M. Roger a défendue après lui. Nous pensons que l'agglutination consiste dans la coagulation et la coalescence des couches externes des microbes agglutinables sous l'influence du sérum agglutinant [3] ».

On le voit, M. Nicolle rattache, raccorde, l'expérience de M. Kraus à la théorie de Gruber. Mais le raccord ainsi établi, le trait d'union ainsi posé, et dont dépend toute la valeur de l'idée, est justement le point faible du raisonnement, celui qui échappe un peu à la compréhension. Pourquoi en effet la précipitation d'une substance agglutinable au sein de la couche externe du

1. Ces *Annales*, mars 1898.

2. Ceci est plus que la simple traduction, en langage courant, de l'expérience même de M. Kraus ; la phrase signifie qu'il faut admettre — un peu hâtivement peut-être — que la substance précipitée est vraiment celle qui joue le grand rôle dans l'agglutination des microbes, qui, en d'autres termes, représente chez le microbe *l'élément sensible à l'agglutinine.*

3. *Loc. cit.*, p. 191.

microbe (précipitation dont nous ne voulons pas nier hâtivement l'existence) amènerait-elle un gonflement, une viscosité capable d'assurer la coalescence, la soudure des couches externes des microbes en présence ?

Quoi qu'il en soit, cette interprétation est aussi peu soucieuse que celle de M. Gruber, avec laquelle elle se fusionne, de faire intervenir, dans l'explication du fait, la notion de lois physiques, de lois d'adhésion moléculaire. Elle ne prévoit pas davantage la possibilité d'un rapprochement entre le fait de l'agrégation de certains précipités chimiques et le fait de l'agglutination microbienne, car elle repose exclusivement, pour l'explication complète du phénomène, sur l'existence d'une membrane, d'une couche externe ou d'une tunique ciliée susceptibles de gonflement et de soudure.

Dans son mémoire paru dans ces *Annales*, M. Nicolle décrit une expérience assurément curieuse. M. Nicolle montre que le précipité provoqué par le sérum actif dans le filtrat de culture a la propriété d'entraîner dans son agglomération des particules inertes préalablement ajoutées au liquide, de la poudre de talc par exemple, qui se réunit ainsi en amas.

L'expérience a son intérêt, mais nous pensons néanmoins qu'on ne peut lui attribuer aucune importance réelle dans l'explication du phénomène de l'agglutination, dont elle ne nous donne qu'une image factice. Ces particules de talc qui s'agglomèrent sont entraînées mécaniquement les unes vers les autres, englobées et charriées par un précipité en voie d'agrégation. Accorder de l'importance à ce phénomène non spécifique, dont la ressemblance avec la vraie agglutination paraît *a priori* superficielle, équivaudrait forcément, — et alors nous nous trouverions en présence d'une interprétation nouvelle — à admettre que l'agglutination proprement dite est due, elle aussi, à ce qu'il se forme un précipité extramicrobien qui se rétracte et s'agglutine, enserrant et englobant les microbes, les forçant ainsi à se rapprocher et finalement à adhérer les uns aux autres. De fait, cette opinion a été émise par M. Paltauf[1] antérieurement au travail de M. Nicolle. M. Dineur, dans un mémoire récent[2], la discute ; il la combat d'ailleurs à l'aide d'arguments

1. Paltauf, *Wiener Klin. Wochenschrift*, 1897.
2. Dineur, Recherches sur le mécanisme de l'agglutination du bacille typhique. — *Bulletin de l'Académie de Médecine de Belgique*, 1898, p. 652.

appropriés. Nous avons à citer cette idée dans la liste des hypothèses émises :

4° *Hypothèse de Paltauf.* — L'agglutination des microbes serait due à ce que ceux-ci sont entraînés mécaniquement dans les mailles d'un coagulum né dans le liquide ambiant, en dehors des microbes, et dû à la réaction de l'agglutinine sur la matière microbienne agglutinable.

5° *Hypothèse de Dineur.* — Pour M. Dineur, l'agglomération serait due à la formation d'une matière adhésive assurant l'adhérence des microbes entre eux. Mais cette matière adhésive se formerait spécialement sur les cils. Aussi M. Dineur attribue-t-il à la présence de cils une importance tout à fait essentielle dans l'agglutination. Celle-ci serait produite par l'adhésion et l'enchevêtrement des cils.

* * *

Nous avons passé en revue, dans les pages précédentes, les diverses interprétations proposées, en insistant sur leur signification précise et sur leurs tendances. Mais nous avons à peine effleuré les faits expérimentaux qui les corroborent ou les font révoquer en doute. C'est l'examen de ces faits que nous allons aborder. Ils sont aujourd'hui assez nombreux pour permettre une discussion suffisamment documentée des diverses théories.

Parmi les interprétations émises, il en est qui manifestement, et sans qu'il soit besoin d'un examen prolongé, ne s'accordent pas avec les faits. Telle est l'idée de M. Dineur qui attribue une importance capitale à l'existence de cils. Une opinion semblable ne saurait satisfaire, attendu qu'on constate l'agglutination de microbes dépourvus de cils et même celle d'éléments (globules rouges, particules de caséine) moins suspects encore de posséder de pareils appendices.

Il est vrai que M. Dineur insiste également sur la production — sous l'influence de l'agglutinine — d'une substance adhésive permettant la réunion des microbes en amas. Il se rallie en cela à l'interprétation de M. Gruber que nous abordons plus loin.

L'interprétation de M. Paltauf, qui explique l'agglutination des microbes par la rétraction d'un précipité (précipité de Kraus), né au sein du liquide et susceptible d'entraîner les microbes dans sa propre agrégation, se heurte à des objections graves. D'abord ce phénomène de précipitation de Kraus n'est pas absolument constant; quand il existe, le précipité n'est jamais bien abondant et se produit avec une lenteur telle, qu'on peut difficilement le considérer comme préexistant à l'agglutination si énergique et si rapide des microbes, comme en étant la cause déterminante. De plus, les observateurs n'ont pu jusqu'ici, en examinant des microbes agglutinés, déceler autour d'eux l'existence d'un coagulum. M. Dineur n'y a point réussi malgré ses efforts répétés : il fait remarquer avec raison que si ce coagulum existait, s'il englobait réellement les microbes, on aurait bien des chances de le mettre en évidence, puisqu'il se colore, ainsi que M. Nicolle l'a montré, par les couleurs basiques.

D'autres remarques encore peuvent être présentées. Des lapins qui ont reçu plusieurs injections intrapéritonéales de sang défibriné de poule, fournissent un sérum doué, vis-à-vis des globules rouges de poule, d'un pouvoir agglutinant et dissolvant énergique. Mais ce sérum actif possède encore une autre propriété. Mélangé au sérum de poule, il fait naître dans ce liquide un précipité qui, assez lentement, devient abondant et s'agglomère en flocons. Cette propriété que possède le sérum des animaux traités de produire un précipité dans un sérum identique à celui qu'on leur a injecté, a été constatée, pour la première fois, par M. Tchistovitch, à l'Institut Pasteur, au cours de recherches récentes. M. Tchistovitch a observé que le sérum de lapins injectés à plusieurs reprises de sérum d'anguille, trouble ce liquide; il retrouva le même fait en étudiant le sérum de lapins qui avaient subi des injections de sérum de cheval : bien entendu, c'était alors ce liquide qui se troublait. Les précipités obtenus par M. Tchistovitch étaient, comme il l'a vu, solubles dans de petites quantités d'alcalis (potasse, soude, AzH_3), fait que nous avons pu constater à notre tour en opérant sur notre sérum de lapin, actif vis-à-vis du sang de poule.

Il paraît légitime de rapprocher ces phénomènes de ceux qui ont appelé l'attention de M. Kraus. Le sérum spécifique extrait des animaux qui ont été injectés eux-mêmes avec un sérum ou

un sang neufs, trouble le sérum neuf identique à celui qui a servi aux inoculations. Le sérum extrait des animaux injectés avec une culture, trouble le liquide de culture semblable à celui qu'on a employé dans la vaccination. Le précipité dont nous parlons est donc au précipité de Kraus ce que l'agglutination des globules est à l'agglutination des microbes : la comparaison est donc justifiée. Or, l'expérience montre que l'existence de ces précipités n'est pas indispensable à la production d'une forte agglutination, et ne lui est même pas corrélative. Le sérum d'un lapin, soumis à des injections réitérées de sang de poule, présente la propriété d'agglutiner (et de dissoudre) les globules et de précipiter le sérum de ce dernier animal. Mais il produit aussi un précipité dans le sérum de pigeon. On s'attendrait donc, corrélativement, à ce que le sérum en question agglutinât fortement aussi les globules du pigeon. Il ne les agglutine que faiblement, sans montrer à cet égard plus d'activité que le sérum de lapin neuf, dont le mélange avec le sérum de pigeon reste entièrement limpide. Cette agglomération est nettement inférieure, comme intensité, à celle que subissent, par exemple, les globules de lapin neuf mis en contact avec du sérum de poule neuve, et qu'aucune précipitation n'accompagne. — D'autre part, des cobayes, soumis à plusieurs injections de sang défibriné de lapin, nous donnent un sérum qui manifeste, vis-à-vis des globules de lapin, un pouvoir agglomérant très intense et qui, cependant, ne produit dans le sérum de ce dernier animal aucun trouble visible. Il n'y a donc pas de parallélisme obligatoire entre l'apparition de précipités et l'existence d'une agglomération intense. L'opinion qui reconnaît la formation de pareils précipités comme la condition *sine qua non* de l'agglutination ne nous paraît donc pas soutenable.

Arrivons à l'hypothèse de M. Gruber qui, dès son apparition, souleva des critiques. On concevait assez facilement que la substance glaireuse, produite par l'enveloppe des microbes, retînt accolés les microbes réunis, mais on voyait moins clairement pourquoi elle les faisait venir rapidement les uns vers les autres. M. Pfeiffer et nous-mêmes ne pûmes trouver trace, par l'examen microscopique pratiqué sur des microbes vivants, colorés, ou sur des globules, de la modification morphologique que cette hypothèse impliquait.

M. Trumpp[1], cependant, pense avoir constaté l'altération des vibrions cholériques sous l'influence de l'agglutination. Mais il a observé ce gonflement des microbes dans des humeurs qui, en même temps que l'agglutinine, contenaient de l'alexine (ou lysine), cette matière bactéricide et globulicide qu'une température de 55° élimine. Cette alexine est énergiquement altérante pour les vibrions comme pour les globules; elle peut dissoudre ces derniers et produire sur les microbes de grands changements, les gonfler, les transformer en granules et même les détruire. Il est évident que M. Trumpp aurait dû, pour apprécier l'influence propre de l'agglutinine, se servir de liquides préalablement débarrassés de l'alexine dont ils étaient chargés[2].

Des globules rouges agglomérés par un sérum provenant d'une espèce animale différente nous ont paru avoir gardé leur aspect normal; ils restent normaux également quand on les soumet à l'action d'un sérum antihématique actif, qu'une exposition préalable à la température de 55° a dépouillé de l'alexine dissolvante sans altérer l'agglutinine. Du reste, l'hypothèse que ces éléments différents, microbes divers, globules rouges, subiraient tous, au contact d'un sérum actif, la même modification, n'a guère la vraisemblance pour elle. L'existence de cette altération visqueuse est encore moins probable, lorsqu'il s'agit non plus d'éléments organisés, microbes, globules rouges, mais de particules d'une substance chimique, telle que la caséine du lait. On peut obtenir un sérum qui « agglutine le lait », c'est-à-dire qui rassemble en amas les particules de caséine.

Dira-t-on que la surface de ces particules est devenue gluante, visqueuse sous l'influence du sérum actif? Admettra-t-on que c'est à la faveur de cette viscosité qu'elles peuvent se coller les unes aux autres? Il faudrait à ce compte accepter aussi que des particules d'argile en suspension homogène dans de l'eau distillée, se recouvrent également d'un enduit spécial, visqueux et gluant, lorsqu'on ajoute, au liquide où elles baignent, un peu de chlorure de sodium. On le sait, la présence de sel dans

1 Trumpp. *Archiv für Hygiene,* 1898.

2. On peut faire une observation semblable à propos des constatations faites par M. Roger (*Revue générale des Sciences* (1896) et qui sont relatives aux modifications subies par l'*oïdium albicans* lorsque ce microorganisme est soumis à l'influence du sérum actif. — Dans un mémoire, paru tout récemment, MM. Kraus et Seng (*Wiener Klin. Wochenschrift* 1899, n° 1) emettent, à propos des observations de M. Trumpp et de M. Roger, les mêmes critiques.

une eau qui tient en suspension de l'argile finement divisée suffit à provoquer la formation de flocons qui se déposent bientôt au fond du vase: c'est un fait dont les géologues apprécient l'importance, et qui, favorisant les sédimentations, a son rôle dans la physique du globe.

L'existence de cette matière adhésive, qui fait la base des hypothèses de M. Gruber et de M. Dineur, semble à ce dernier auteur corroborée par une expérience significative. — M. Dineur constate que si l'on imprime des mouvements passifs assez lents à une émulsion de microbes qui vient d'être additionnée de sérum spécifique, l'agrégation des microorganismes est beaucoup favorisée. Les amas se forment et grossissent plus rapidement. M. Dineur suppose que le roulement des microbes les uns sur les autres, favorisant leur rencontre, enchevêtre leurs cils et permet la mise en jeu efficace de la matière gluante dont les cils seraient revêtus, et qui assure l'adhésion définitive.

Le fait observé par M. Dineur est exact, mais l'interprétation qu'il émet ne paraît pas l'être. En effet, l'influence favorisante des mouvements passifs pour la constitution des flocons s'observe aussi, avec beaucoup d'évidence, sur des précipités inertes non organisés. Si l'on verse une goutte de sérum dans 5 à 6 c. c. environ de solution de NaCl à 0,7 0/0 et, si on ajoute de l'acide nitrique, il se forme un trouble albumineux qui, laissé à lui-même, ne s'agglomère que lentement. Mais si, peu de temps après la formation du précipité, on verse dans un tube une petite quantité de ce liquide, et si l'on imprime à ce tube, tenu presque horizontalement, un mouvement lent de balancement léger qui se communique au liquide étalé, on trouve qu'au bout de quelques minutes, le précipité s'agglutine en petits grains blancs qui flottent dans le liquide devenu clair. Au contraire, le liquide laissé au repos garde pendant assez longtemps un trouble homogène. Le contraste entre les deux tubes est frappant. On peut faire la même expérience avec d'autres précipités albumineux (précipité de caséine naissant dans le sérum du lait sous l'influence de l'acide nitrique). Le phénomène sur lequel M. Dineur insiste s'observe aussi avec une extrême netteté dans l'agglutination du lait par le sérum actif vis-à-vis de ce liquide.

L'observation de M. Dineur, loin de plaider pour la théorie

de Gruber, établit donc une analogie, au point de vue de l'agglutination, entre les microbes et des particules non organisées. Il en existe une autre, plus significative.

On sait que l'agrégation de précipités est souvent commandée par des causes en apparence minimes, parmi lesquelles on a décelé parfois la présence de sels en solution dans le liquide. Un exemple net est fourni par l'argile divisée qui, dans l'eau distillée reste en émulsion fine et homogène, s'agglutine au contraire et se dépose rapidement dans une eau qui contient du chlorure de sodium. Dès lors, si l'on admet que l'agglutination des microbes relève aussi de lois d'adhésion moléculaire, on peut supposer que les sels ne sont pas sans influence sur ce phénomène. C'est ce que l'expérience vérifie.

On délaie quelques cultures de vibrion cholérique, âgées de 24 heures, dans la solution de NaCl à 0,7 0/0 (10 c. c. de liquide pour une culture). L'émulsion bien homogène obtenue est additionnée d'une dose énergiquement agglutinante de choléra-sérum. Les microbes forment rapidement des flocons qui se déposent au fond du tube. On centrifuge. On décante ensuite le liquide clair qui surnage, de façon à ne plus laisser dans le fond du tube que le dépôt compact de microbes agglomérés; on délaie les microbes dans très peu d'eau, et l'on obtient ainsi une émulsion assez épaisse. On répartit cette émulsion en quantités égales, dans deux tubes. On remplit le premier avec de l'eau distillée, le second avec la solution de NaCl à 0,7 0/0. On recentrifuge après avoir bien agité et délayé. On constate bientôt que, sous l'action de la turbine, les microbes se déposent plus vite dans le tube qui contient l'eau physiologique que dans celui où l'on a versé de l'eau distillée. Les dépôts formés, on reprend les 2 tubes, on décante les liquides surnageants, on les remplace par des liquides identiques : d'une part, eau physiologique, d'autre part, eau distillée. On agite pour bien dissocier les microbes.

On constate que les *amas se reconstituent rapidement dans le tube contenant* 0,7 0/0 NaCl; *les microbes restent au contraire indéfiniment épars dans celui qui renferme l'eau distillée.* Mais si l'on retire une certaine quantité du liquide trouble de ce second tube, si l'on en transvase par exemple 10 c. c. dans un nouveau tube, où l'on introduit ensuite 0.07 gr. de chlorure de sodium, *on*

constate que dans cette eau distillée additionnée de 0.7 0/0 de NaCl, l'agglutination réapparaît et que le dépôt des microbes s'opère[1].

Ce qui s'observe pour l'agglutination spécifique du vibrion cholérique se vérifie aussi pour ce qui *concerne l'agglomération de ce vibrion par les sérums d'animaux neufs.* Nous avons fait voir il y a trois ans que le sérum de cheval neuf agglutine, avec une énergie très réelle, le vibrion cholérique et d'autres microbes encore (b. typhique, b. coli, b. du tétanos). L'expérience précédente, faite non plus avec du sérum spécifique, mais avec du sérum de cheval neuf agissant sur le vibrion cholérique, donne des résultats tout à fait conformes.

Il n'est même pas nécessaire, dans ce cas, d'enlever les traces de NaCl par des lavages répétés. On se borne à centrifuger l'eau physiologique chargée des microbes agglomérés; on décante ensuite le liquide en ne laissant que le dépôt : celui-ci est alors divisé en deux parts que l'on place dans deux tubes; on remplit l'un de ces tubes avec de l'eau distillée, l'autre avec la solution de NaCl. On agite et l'on voit l'agglutination réapparaître seulement en présence de sel[2].

1. Il faut remarquer que cette « réagglutination » des microbes dans l'eau distillée, à laquelle on rajoute du sel, ne se fait pas tout à fait aussi vite que dans le tube où les microbes ont été toujours en contact avec l'eau physiologique — surtout quand le contact avec l'eau distillée a été trop prolongé. Il est probable que, pour bien s'agglutiner, les microbes doivent garder en eux une certaine dose de sel, qui n'en sort ou qui n'y rentre qu'au bout d'un certain temps.

2. L'existence du pouvoir agglutinant dans les sérums (même dans les sérums neufs) a sans doute vicié nombre de recherches faites au sujet de la propriété bactéricide des humeurs. Beaucoup d'observateurs ont employé, en effet, pour évaluer la puissance destructive d'un sérum vis-à-vis d'une certaine espèce microbienne, la méthode des ensemencements successifs, sur gélatine, de petites quantités de ce sérum en contact avec les microbes. Or, un sérum quelconque, ensemencé d'une petite dose de microbes, peut agglutiner ces derniers en amas qui, transportés ensuite sur gélatine, ne donnent chacun qu'une colonie. La cause d'erreur a naturellement grande importance dans les recherches portant sur des microbes très facilement agglutinables, tels que le bacille de la fièvre typhoïde.

On a certainement admis, fréquemment, l'existence de véritables propriétés bactéricides alors qu'il s'agissait simplement d'actions agglutinantes. Il est même probable qu'on a parfois attribué, par suite de la même méprise, aux alexines (matières bactéricides proprement dites) certaines propriétés des agglutinines. M. Buchner admet, par exemple, que l'alexine perd son activité, au moins en grande partie, lorsqu'on la mélange à de l'eau distillée. Or, la présence d'eau distillée dans un sérum doit diminuer en apparence la propriété bactéricide de ce dernier, car elle affaiblit l'agglutination et concurremment tend à augmenter le nombre des colonies qui pousseront sur gélatine après ensemencement. Nous avons pu constater que l'alexine agit très bien dans un milieu pauvre en sels : des vibrions qui ont été impressionnés par du sérum préventif, mais qui ont été lavés et sont en suspension (sans s'agglutiner) dans 15 parties d'eau distillée, se transforment en granules (trahissant ainsi l'action de l'alexine) quand, à ces 15 parties d'émulsion, on ajoute une partie de sérum neuf.

On peut répéter cette expérience, avec le même résultat, en la faisant porter sur du sérum de cheval neuf, et le bacille de la fièvre typhoïde.

On peut la faire encore en mettant en jeu cette fois, non plus des microbes, mais le précipité de Kraus obtenu par le mélange de choléra-sérum et d'une vieille culture filtrée de vibrions. Le précipité est soumis aux manœuvres décrites plus haut : on constate qu'il s'agglomère beaucoup plus fortement dans les liquides qui contiennent du sel que dans l'eau distillée.

Il est utile de reproduire, concurremment avec ces expériences, et en suivant la même technique, le phénomène anciennement connu de l'agglutination d'une émulsion d'argile fine qu'on obtient en délayant de la terre glaise dans l'eau distillée, puis filtrant sur papier, qui ne laisse passer que des particules très ténues. Les tubes qui ne contiennent pas de sel restent troubles pendant des journées entières. Les liquides additionnés de 0.7 0/0 de NaCl présentent une agglutination très énergique et un dépôt rapide. Rien de plus frappant que la ressemblance d'aspect que montrent, avec des amas encore flottants de microbes agglutinés, les flocons blanchâtres d'argile, suspendus dans le liquide, et qui gagnent lentement le fond du vase.

Ces expériences relatives à l'absence de l'agglutination dans l'eau distillée affermissent donc nettement l'idée que l'agglutinine agirait en provoquant sur les éléments, encore isolés à cet instant, des *changements tels, que leurs propriétés d'adhésion moléculaire deviendraient comparables à celles que présentent d'emblée les particules d'argile*. Il suffit dès lors, dans l'un et l'autre cas, d'*ajouter du sel pour amener effectivement le phénomène physique — désormais possible — de l'agglutination*. Il y a là, à nos yeux, une confirmation de l'hypothèse que nous avons émise et rappelée au lecteur.

*
* *

Les phénomènes d'agglutination, ainsi conçus, peuvent conduire à des généralisations intéressantes si l'on projette sur eux la lumière des idées émises par M. Duclaux à propos de la coagulation. Qu'est-ce en effet que l'agglutination? C'est la réunion en amas de particules organisées d'abord éparses, qu'une influence spéciale a impressionnées, et dont les propriétés d'adhésion moléculaire ont changé. Qu'est-ce en effet que la coagulation, d'après

M. Duclaux? C'est la réunion, en groupements, de particules — pouvant du reste être parfois extrêmement divisées, présenter même au sein d'un liquide les apparences d'une solution — de particules dont les relations d'adhésion moléculaire d'une part avec le liquide, d'autre part avec les particules voisines, ont été modifiées sous une certaine influence. Avant l'intervention de cette influence, le liquide restait homogène. Cette influence se faisant sentir, « l'état d'équilibre entre la pesanteur et les forces moléculaires est troublé, et soit que l'adhésion entre le liquide et le solide ait diminué, soit, ce qui est plus probable, que la force d'attraction entre les particules du solide ait augmenté, celui-ci se réunit en agrégats de plus en plus volumineux, qui deviennent visibles à l'œil nu et se précipitent [1]. »

Ce sont ces changements dans l'adhésion moléculaire qui amènent les particules (dont la nature chimique peut, dans les différents exemples, être très diverse) si fines souvent que le microscope ne les peut déceler, à s'agréger en amas d'abord invisibles encore et que rien ne trahit à l'œil, grossissant ensuite en troublant le liquide par le même phénomène d'amoncellement progressif, jusqu'à constituer des groupements volumineux nés d'une condensation moléculaire de plus en plus abondante.

Nous n'avons pas à suivre M. Duclaux dans les développements réguliers qu'il donne à cette idée, ni à faire remarquer quelle œuvre d'unification accomplit dans l'étude des phénomènes cette conception capable de relier d'un lien très intime des faits épars dont l'étroite parenté n'était point soupçonnée.

C'est un lien semblable qui unit les faits d'agglutination aux phénomènes de coagulation ainsi conçus. L'agglutination des bacilles est due à un changement dans les rapports d'adhésion moléculaire entre les corps des bacilles et le liquide qui les contient. Ainsi que s'exprime M. Duclaux, ce phénomène, « dans son ensemble comme dans ses détails, nous rappelle ce que nous avons vu et décrit, dans le chapitre consacré aux phénomènes de coagulation [2]. »

Dès lors, si nous avons le droit — qu'affirme M. Duclaux — de considérer l'agglutination comme étant un phénomène

1. Duclaux, *Traité de microbiologie*, tome II, p. 263.
2. Duclaux. *Ibid*, p. 706.

de coagulation: si nous sommes autorisés à donner désormais à la substance active du sérum, non plus le nom d'agglutinine, qui se borne à indiquer le fait même sans rien préjuger des affinités ni des causes, mais l'appellation plus suggestive de « coaguline », — nous pouvons supposer que les organismes, en raison de leur plasticité fonctionnelle, de la multiplicité de leurs ressources, seront à même d'élaborer, si on leur en fournit l'occasion, des principes agglomérants actifs non plus cette fois vis-à-vis d'éléments organisés, mais à l'égard de substances chimiques caractérisées, auxquelles on reconnaît depuis longtemps la *qualité d'être caogulables*.

C'est une supposition que l'expérience vérifie. Si l'on pratique sur des lapins, à plusieurs reprises, des injections intrapéritonéales de lait (qu'on a chauffé pendant une heure à 65° pour le stériliser au moins partiellement), on peut, au bout d'un certain temps, obtenir un sérum doué vis-à-vis du lait de propriétés spéciales.

On verse dans un tube une certaine quantité (3 c. c. par exemple) de ce sérum. Dans d'autres tubes on met, pour comparer, des quantités équivalentes de divers échantillons de sérum de lapin neuf. On verse dans les divers tubes une dose pas trop forte de lait, dix ou quinze gouttes par exemple. — On constate bientôt que les tubes contenant le sérum neuf conservent l'opacité blanche et homogène due à la présence du lait. Dans le tube renfermant le sérum actif, *on voit naître rapidement des grains d'abord fins qui grossissent bientôt et forment des flocons épais.* Bientôt le liquide se sépare en deux parties, l'une qui redevient entièrement limpide, l'autre qu'occupent les flocons agglomérés. Parfois les flocons descendent au fond du vase, et c'est la partie supérieure qui se clarifie. Cela arrive quand on emploie du lait assez pauvre en graisse, ou plus sûrement encore du lait qui a passé 2 ou 3 fois à travers un papier à filtre [1], et qui s'est ainsi dépouillé d'une partie de ses globules gras. Si l'on emploie du lait riche en graisse, les flocons gagnent la partie supérieure du liquide, entraînés par la légèreté des globules gras qu'ils ont englobés.

1. Les expériences sont peut-être plus élégantes quand on emploie un lait ainsi filtré. Ce lait est en effet plus propre, ne tache pas de blanc les verres qu'il a touchés, rend ainsi les liquides moins opaques; on juge plus nettement alors de l'apparition de l'agglutination.

Si l'on jette sur des filtres en papier de tels mélanges de lait avec du sérum neuf, d'une part, du « *lactosérum* », de l'autre, ce second liquide passe d'emblée tout à fait limpide, dépouillé entièrement de la blancheur trouble que le lait lui avait communiquée ; les liquides à base de sérum neuf passent avec un louche intense.

L'examen au microscope des mélanges de lait avec les sérums montre qu'il s'est produit, sous l'influence du lactosérum, des îlots granuleux très abondants qu'on ne trouve pas dans les mixtures de sérum neuf et de lait. Ce précipité en îlots est tout à fait semblable à des grumeaux de caséine, résultant de l'action de la présure sur le lait[1]. Certains agrégats sont composés uniquement du fin précipité granuleux : d'autres englobent un grand nombre de globules gras qu'ils emprisonnent dans leur substance.

Si à du lactosérum, on a ajouté une quantité de lait *un peu supérieure à celle qu'il peut agglutiner*, il ne s'en forme pas moins un dépôt très abondant de matière agglomérée. Si l'on attend que le dépôt de tous les amas, même les plus petits, se soit opéré, on trouve que le liquide surnageant est devenu presque entièrement limpide, et l'œil n'y décèle plus rien. Séparé par décantation et mélangé à du sérum neuf, il ne donne aucun trouble ; le liquide reste bien transparent. Si on l'additionne de lactosérum, on voit au bout de quelques instants un léger trouble survenir, qui s'accentue bientôt ; ultérieurement des flocons se constituent et forment un dépôt qui peut encore être abondant. Ce lactosérum a aggloméré de la caséine extrêmement divisée, troublant à peine le liquide, et qui avait échappé à l'action agglutinante d'une première dose, (insuffisante) de sérum actif.

On peut faire une expérience analogue de la manière suivante : Nous avons dit plus haut que le sérum neuf additionné de lait, (par ex. 4 c. c. de sérum contenant 10 gouttes de lait) passe

1. Nous ne voulons pas en déduire, bien entendu, que l'agglutinine du lactosérum soit identique, dans sa nature, à la présure. Il existe entre ces substances des différences très grandes. L'action de l'agglutinine dépend beaucoup moins que celle de la présure, de la température ; elle agit à des températures basses où la présure est presque inactive. Notre sérum n'a pas, à petites doses, la propriété que possède la présure, d'agréger en caillot des quantités véritablement énormes de caséine en suspension. D'autre part, la présure ne produit guère d'effet constatable dans un mélange d'une forte dose de sérum neuf et d'une petite quantité de lait, tandis que, dans ces conditions, l'agglutination apparaît si l'on ajoute du lactosérum au mélange.

trouble à travers un filtre de papier. Mais si l'on répète un certain nombre de fois la filtration à travers le même filtre, on arrive à clarifier beaucoup le liquide, qui finit par ne plus présenter qu'une opalescence à peine perceptible, pouvant facilement passer inaperçue. Ce liquide, examiné au microscope, est très pauvre en globules gras, dont on ne trouve que de rares et très petits échantillons, et l'on n'y découvre pas d'autre élément visible. Si on en mélange une certaine dose avec partie égale de sérum neuf, aucun phénomène ne se produit. Mêlé à du lactosérum, à dose égale, le liquide d'abord transparent se trouble rapidement, et bientôt s'agglutinent des amas blancs de caséine, assez volumineux, et qui au microscope reproduisent les îlots granuleux identiques à des parcelles de caillot formé sous l'influence de la présure.

On peut aussi faire naître de semblables précipités dans du sérum de lait obtenu par l'action suffisamment prolongée, sur le lait, de la présure. Ce sérum filtré sur papier est à peine opalescent, il ne se trouble pas au contact du sérum neuf; il donne, sous l'action du lactosérum, un trouble intense qui se condense bientôt en flocons. On sait que le sérum du lait contient encore de la caséine qui a échappé à l'action de la présure, mais qui donne par l'addition d'un acide, un précipité volumineux.

*
* *

N'y a-t-il pas, dès à présent, des analogies à établir entre l'apparition, sous l'influence du lactosérum, de précipités floconneux au sein de liquides limpides où la caséine extrêmement divisée ne trahit sa présence que par une opalescence presque imperceptible, — et la production des précipités qui naissent dans un mélange de deux sérums, dans les conditions indiquées plus haut? Notre sérum actif d'un lapin qui a été injecté de sang de poule, fait naître dans le sérum de poule un précipité abondant : ne peut-on pas admettre que, dans ce cas aussi, le sérum actif en jeu agrège des groupements moléculaires, tellement épars et dissociés auparavant qu'ils ne troublaient pas la limpidité de la liqueur? Les précipités produits dans de pareils mélanges de sérums résulteraient donc d'un phénomène d'agglutination [1] ou

1. Le fait suivant corrobore cette manière de voir : La propriété (caractéristique du sérum actif de lapin) de faire naître un précipité dans le sérum de poule, s'affaiblit si ce sérum actif a été porté au préalable, pendant 1/2 heure, à la température de 65°; elle disparaît s'il a été chauffé pendant le même temps à

si l'on veut, de coagulation, car ici nous ne savons plus du tout lequel des deux termes nous devons employer.

Ne doit-on pas d'autre part établir une analogie entre l'apparition de ces précipités, et l'agglutination des microbes ou des globules, la condensation en amas volumineux de particules figurées, d'abord uniformément dispersées?

Le seul fait qui distingue les phénomènes dans tous ces cas divers, c'est que les particules agglutinables sont dans certains exemples tellement fines et divisées qu'elles n'altèrent point, avant leur condensation, la clarté du liquide ; parfois au contraire, elles sont assez volumineuses (telles sont les corpuscules microbiens ou hématiques), pour communiquer au liquide avant toute agrégation un trouble évident à l'œil nu.

Mais cette variété dans la grosseur originelle des particules en jeu n'est qu'une circonstance accessoire, n'intervenant pas dans la conception de l'essence même des phénomènes. La distinction créée par elle n'est que secondaire et ne saurait changer en rien la conclusion, *que rien de fondamental ne sépare les phénomènes d'agglutination de ceux de coagulation.*

La coagulation de l'argile, par exemple, se relie, grâce aux idées de M. Duclaux, à la coagulation du lait ; elle se rattache à l'agglutination des microbes par les expériences sur le rôle du chlorure de sodium ; en outre, l'agglutination des microbes se rapproche de la coagulation du lait, grâce à l'existence du lactosérum agglutinant, lequel peut provoquer d'autre part dans des liquides, des coagulations comparables aux précipitations observées dans le mélange d'un sérum neuf avec un sérum spécifique particulier, ce dernier lui-même s'obtenant par l'application aux animaux, d'une méthode d'injections entièrement comparable à celle qui fournit les sérums capables d'agglomérer les microbes. Les traits d'union se multiplient donc entre tous ces phénomènes, et c'est pourquoi nous sommes forcés d'admettre, pour tous, étant données les analogies qui les unissent, une même explication

70°. Or, après un tel chauffage à 65°, et bien plus encore après un chauffage à 70°, le sérum a perdu également, en grande partie, la propriété agglutinante qu'il manifestait vis-à-vis des globules rouges de poule. Pour ce qui concerne l'action de la chaleur, la substance précipitante se comporte donc comme une agglutinine. Au contraire, la substance précipitable du sérum de poule résiste parfaitement à un chauffage, pendant une demi-heure, à la température de 75° ; un sérum de poule chauffé de la sorte, précipite encore sous l'action du sérum actif de lapin.

commune et générale, attribuant l'apparition de l'agglutination à des changements dans l'adhésion moléculaire.

Si, pour choisir un exemple parmi ces exemples divers, mais semblables, nous revenons à l'agglutination spécifique des microbes, nous pourrons admettre que l'agglutinine qui se fixe sur les microbes, agit en modifiant les rapports d'attraction moléculaire qui unissent les particules microbiennes, d'une part avec leurs voisines, d'autre part, avec le liquide ambiant. L'agglutinine ne touche qu'à certaines espèces microbiennes déterminées. *Pendant cette première période, la notion de la nature et de la constitution organisée propre du microbe entre en lumière avec beaucoup d'évidence.* Probablement même faut-il, pour que les microbes soient bien sensibles à l'action de l'agglutinine, qu'ils soient dans un état d'intégrité suffisant, ainsi que tendent à le prouver certaines expériences de M. Malvoz [1].

Mais *dès que l'effet produit sur l'adhésion moléculaire est obtenu, les microbes s'agrègent comme le feraient des particules inorganisées,* sans qu'il soit dès lors nécessaire de faire intervenir encore la notion de leur organisation propre, sans qu'il soit indispensable surtout d'admettre que les microbes adhèrent les uns aux autres, comme une étiquette collée à un flacon, par l'intermédiaire d'une matière adhésive spéciale, dont les cils ou la membrane gonflée seraient enduits. Ce phénomène de rapprochement des particules sous l'influence d'un changement dans les relations d'attraction moléculaire, doit par définition être rangé parmi les phénomènes de coagulation tels que M. Duclaux les caractérise.

Nous le répétons, cette manière de voir divise le phénomène total de l'agglutination en *deux phases bien distinctes.* Dans la première, les microbes encore épars sont touchés par l'agglutinine, qu'ils fixent; ils subissent, de ce chef, des modifications dans leurs propriétés d'adhésion moléculaire. Dans la seconde, ces modifications provoquent l'agglutination proprement dite.

Cette distinction en deux périodes n'est point artificielle ni factice. On peut en effet *dissocier ces deux phases, faire apparaître la première sans provoquer la seconde.* C'est ce que réalise l'expérience citée plus haut, qui met en évidence le rôle du chlorure de sodium. Les microbes lavés, en suspension dans l'eau distil-

1. Malvoz, *Recherches sur l'agglutination du bacille typhique.* Ces *Annales,* juillet 1897.

lée, ont subi l'impression par l'agglutinine ; ils sont immobilisés, (ajoutons ici qu'ils sont en outre devenus très sensibles à l'action de l'alexine) ils sont préparés à être agglutinés avec énergie. Mais il faut, *pour que la seconde phase du phénomène se déroule*, introduire dans l'émulsion un peu de sel marin, nécessaire à l'agglutination proprement dite.

Quant au phénomène de Kraus, son interprétation n'est pas mûre. Il n'est point démontré que le précipité de Kraus ait quelque chose à faire avec la véritable agglutination des microbes : il se peut en effet que ce précipité soit comparable à celui qu'on obtient en mélangeant du sang défibriné de poule à du sérum actif de lapin (injecté préalablement de sang de poule), et qui ne paraît avoir aucun rapport avec l'agglutination des globules eux-mêmes. Mais si le précipité signalé par Kraus était formé de la vraie matière agglutinable des microbes, il faudrait, nous semble-t-il, le rapprocher, au point de vue de son mode de production, des précipités de caséine que le lactosérum produit dans des milieux (sérum de lait filtré, par exemple) où cette substance est tellement divisée qu'elle ne trouble point la limpidité du liquide.

Cette précipitation représenterait donc, dans cette hypothèse, une agglutination de matière microbienne très divisée.

*
* *

L'idée que l'agglutination des éléments figurés, globules, microbes, ou de particules non organisées, caséine, se présente avec les caractères d'un phénomène de coagulation, doit suggérer quelques réflexions relatives à la signification des propriétés actives du sérum.

Enumérons d'abord brièvement, sans répéter en détail le texte de nos notices antérieures, les propriétés essentielles, constatables *in vitro*, que nous avons reconnues aux sérums spécifiques ou, pour préciser, à deux sérums que nous prendrons pour types, le choléra-sérum, et le sérum actif vis-à-vis des globules de lapin (sérum provenant de cobayes injectés de sang de lapin). Ces sérums ont des propriétés tout à fait semblables, et nous avons insisté récemment sur leurs analogies. Ces propriétés sont les suivantes :

1° Ces sérums agglutinent les éléments figurés, en supprimant la mobilité dont ceux-ci peuvent être doués.

2° Lorsque les vibrions ou les globules ont été en contact avec ces sérums, ils deviennent plus aptes à ressentir l'influence altérante, destructive de l'alexine; (l'alexine ou lysine étant, on le sait, cette matière bactéricide et globulicide, qu'une température de 55° détruit, et qui peut fonctionner vis-à-vis de certains éléments délicats, vibrions, globules, comme une sorte de diastase dissolvante). Ces deux propriétés se retrouvent encore dans les sérums qui ont été chauffés à 55° ou 60°.

3° Ces sérums (à l'état frais) possèdent de l'alexine; et c'est pourquoi, agissant sur les éléments qu'ils ont sensibilisés, ils les altèrent profondément (transformation des vibrions en granules, destruction des globules) et même leur font subir des phénomènes de dissolution partielle.

Si nous ne voulons énumérer que les propriétés réellement caractéristiques de ces sérums, nous pouvons éliminer la troisième, celle de posséder de l'alexine. En effet, cette propriété appartient tout aussi bien aux sérums d'animaux neufs. Après avoir fait disparaître cette alexine dans le sérum spécifique en question, au moyen du chauffage à 55°, après en avoir détruit, corrélativement, le pouvoir bactéricide ou globulicide, on peut leur restituer l'alexine, reconstituer en même temps ce pouvoir, en ajoutant aux liquides un peu de sérum neuf [1].

Restent donc deux propriétés qui, à la vérité, se rencontrent encore à un certain degré dans les sérums neufs, mais qui n'y sont que faiblement représentées. On peut donc les considérer, lorsqu'elles sont très intenses, comme caractérisant les sérums d'animaux vaccinés.

Nous n'abordons pas ici la question de savoir si ces deux propriétés sont dues à la présence de deux substances distinctes, ou s'il faut les attribuer à l'activité d'une seule et même matière; nous nous réservons de revenir sur cette question dans une notice prochaine. Quoiqu'il en soit, la plus remarquable de ces deux propriétés est celle de sensibiliser les éléments à l'action de l'alexine.

1. Voir, pour le détail de ces expériences relatives au vibrion cholérique, notre mémoire paru dans ces *Annales*, juin 1895, et pour ce qui concerne les globules, le n° d'octobre 1898.

Quand nous disons qu'il existe, dans les sérums spécifiques, une *substance sensibilisatrice*, cela implique nettement que les sérums agissent directement sur ces éléments. Cette substance sensibilisatrice a en effet une prédilection toute spéciale à se fixer sur les éléments qu'elle peut impressionner.

Des vibrions cholériques transportés en quantité suffisante dans un liquide contenant du choléra-sérum, en absorbent les principes actifs. Si l'on centrifuge et si l'on décante le liquide clair surnageant, on constate que ce dernier a perdu, en même temps que son pouvoir agglutinant, la faculté de sensibiliser de nouveaux microbes à l'action de l'alexine. En d'autres termes, de nouveaux vibrions mis en contact avec le liquide *ne sont plus immobilisés ni agglutinés et peuvent être injectés dans le péritoine d'un cobaye ou mélangés* in vitro *avec du sérum neuf sans présenter la transformation en granules*. Le même phénomène d'absorption, de fixation, se produit si on cultive des vibrions dans un bouillon additionné d'une quantité pas trop forte de choléra-sérum. Les microbes qui se développent *dépouillent le liquide à la fois de toutes ses propriétés spéciales* [1]. Les mêmes faits se vérifient pour ce qui concerne les sérums actifs vis-à-vis des globules rouges. Ceux-ci, mis en contact avec le sérum, absorbent la substance agglutinante et aussi la substance sensibilisatrice [2]. Le liquide qu'on sépare par centrifugation d'un tel mélange est inactif sur de nouveaux globules. Ajoutons que les agglutinines des sérums neufs sont également

1. Ce résultat de nos expériences est en contradiction complète avec les faits observés par M. Pfeiffer (*Centralblatt für Bakteriologie*, 1896), qui a fait cette dernière expérience. M. Pfeiffer constate bien qu'il y a absorption de l'agglutinine, mais il déclare que le liquide séparé des microbes qui y ont proliféré, garde la propriété de provoquer le phénomène de transformation granuleuse si on l'injecte, mêlé à de nouveaux vibrions, dans le péritoine d'un cobaye neuf. D'ailleurs, la conclusion de M. Pfeiffer, d'après laquelle les sérums actifs n'agiraient pas (sur les microbes) de la même manière *in vitro* et dans le péritoine, est erronée. L'action *in vivo* et *in vitro* est la même. L'expérience montre que *la dose minimale de choléra-sérum qu'il faut nécessairement introduire* dans une émulsion de vibrions, *pour que ceux-ci se transforment en granules* lorsqu'on les met en contact (à la suite de l'injection dans le péritoine) avec l'alexine dont *l'exsudat péritonéal est chargé, est identique à celle* qu'on doit faire agir sur les vibrions pour que ceux-ci *se transforment en granules*, *in vitro*, lorsqu'on les met en contact avec *l'alexine du sérum neuf. L'action directe que le sérum exerce sur le microbe dans le péritoine et in vitro est la même.* Cette dose minimale est aussi, pour les vibrions, très voisine de la dose minimale agglutinante. Nous reviendrons prochainement sur ces questions.

2. Nous devons noter ici que M. Ehrlich (*Berliner Klin. Wochenschr.* 1899, n° 1), a vu récemment qu'un sérum antihématique épuisé par le contact avec des globules, est devenu incapable de constituer, avec le sérum neuf, un mélange dissolvant pour de nouveaux globules.

absorbées par les globules ou les microbes[1]. Tout ceci nous montre que les organismes, pendant le cours de la vaccination, se distinguent en ce qu'ils élaborent, non pas des quantités très fortes de cette « diastase dissolvante », l'alexine, mais *des substances favorisant l'action de cette diastase*, des principes capables de se fixer sur les éléments et de les *sensibiliser à l'influence de cette alexine*.

C'est donc grâce surtout à ces substances favorisantes que les sérums des vaccinés sont capables de produire, si les éléments atteints ne présentent pas une trop grande résistance, ce qui est malheureusement le cas pour un grand nombre de microbes[2] des phénomènes de digestion bien accusés. Nous pouvons donc considérer de tels sérums comme analogues aux sucs digestifs.

Cette analogie qui se dessine entre les propriétés des sérums actifs et des sucs digestifs se confirme si l'on songe que les substances actives du sérum ont vraisemblablement pour sources les cellules digestives que M. Metchnikoff a fait connaître, dont le rôle dans l'immunité est si important, et qui se rattachent, dans l'évolution, à ces cellules amiboïdes capables, chez les organismes simples, d'assurer la nutrition de l'être, grâce à leurs fonctions de digestion intracellulaire. Ce sont des cellules semblables, suivies par M. Metchnikoff à travers la hiérarchie des êtres, qui assument, chez les espèces peu différenciées, toute la fonction digestive. Bien plus, ce sont de pareilles cellules

1. Nous dirons à ce propos quelques mots d'une expérience assez curieuse qui, à vrai dire, sort un peu du sujet de cette notice. Si l'on met une certaine dose d'un sérum *neuf* doué de propriétés agglutinantes assez fortes, (sérum de cheval *neuf*) dans une émulsion de vibrions cholériques, on constate une certaine agglutination. Si l'on centrifuge et qu'on sépare le liquide clair, on constate que ce dernier n'agglutine plus le vibrion cholérique, mais qu'il agglutine encore fortement le bacille typhique. Inversement, si l'on met en contact une nouvelle quantité de ce même sérum de cheval neuf, avec une émulsion de bacilles typhiques, on constate que le liquide décanté après centrifugation est devenu incapable d'agglutiner le bacille typhique, mais agglutine encore le vibrion cholérique. Il semble donc tout à fait certain que ces deux microbes différents prennent à un même sérum deux agglutinines différentes. Il semble que la spécificité des agglutinines, qui caractérise si nettement les sérums des vaccinés, existe déjà en germe chez l'animal neuf. De telles expériences pourront sans doute éclairer quelque peu la question si obscure de l'origine de la spécificité des propriétés actives des sérums. On peut concevoir en effet que la vaccination contre tel microbe s'accompagne de la production en grande quantité de telle agglutinine spéciale, qui préexistait à faible dose.

2. On sait que le bacille typhique, le bacille coli, par exemple, ne présentent qu'avec difficulté, même en présence du sérum actif, la transformation en granules. Nombre de microbes sont moins sensibles encore aux propriétés bactéricides.

amiboïdes qui représentent l'origine de nos appareils digestifs. car M. Metchnikoff a établi que la digestion, d'abord uniquement intracellulaire, devient dans l'évolution, extracellulaire, parce que ces cellules acquièrent la propriété de sécréter au dehors leurs sucs dissolvants.

La source des agglutinines, des substances sensibilisatrices, n'est pas définie il est vrai; mais pour ce qui concerne l'alexine, le principe dissolvant proprement dit, des observations nombreuses s'accordent à lui reconnaître une origine leucocytaire.

Nous ne voulons pas, dans un sujet entouré encore de tant d'obscurités, donner un caractère absolu à des rapprochements qui néanmoins se présentent dès l'heure actuelle à l'esprit. Toutefois, des caractères importants rapprochent les sérums actifs des sucs digestifs, et l'analogie s'expliquerait si, comme divers faits et des présomptions sérieuses le rendent probable, l'élaboration des substances actives devait être attribuée au système phagocytaire, à cet ensemble de cellules douées à un haut degré de propriétés digestives qu'elles ont conservées au cours de l'évolution tout entière.

Si les faits que l'avenir apportera plaident dans le même sens, on arrivera à cette conclusion que l'immunité apparaît de plus en plus, non seulement au point de vue biologique (ceci est solidement établi à l'heure présente) mais aussi au point de vue chimique, comme un cas particulier de la Physiologie générale de la Digestion.

* * *

CONCLUSIONS

I. Les théories qui expliquent l'agglutination microbienne par le gonflement et la viscosité, soit des membranes, soit des cils, se heurtent à de nombreuses objections et n'expliquent pas tous les phénomènes d'agglutination. Il en est de même de la théorie qui reconnait comme cause à l'agglutination la formation d'un précipité au sein du liquide.

II. L'agglutination peut porter sur des éléments très divers (globules, microbes, caséine). On doit admettre, pour les divers cas de l'agglutination par les sérums, une même explication.

III. On est autorisé à admettre que les agglutinines, en se fixant sur les éléments agglutinables, amènent des modifications

dans les attractions moléculaires qui unissent ces éléments soit entre eux soit avec le liquide ambiant. Le phénomène total de l'agglutination doit être divisé en deux phases, dont on peut expérimentalement produire la première (période de l'impression par l'agglutination des éléments encore isolés) sans provoquer la seconde (période de l'agglutination proprement dite). Dans la première phase seulement, la nature propre des éléments intervient. Dans la seconde phase, les particules, obéissant à des attractions moléculaires, peuvent présenter, dans leur agglutination, des particularités qu'on retrouve dans l'agrégation de particules minérales.

IV. Les phénomènes d'agglutination se rapprochent intimement des phénomènes de coagulation.

V. On peut provoquer des phénomènes de vraie agglutination dans des liquides limpides, où les particules sont extrêmement divisées.

VI. On peut comparer dans une certaine mesure, au point de vue des propriétés coagulantes et dissolvantes, les sérums actifs et les sucs digestifs. On est amené à prévoir que l'immunité apparaîtra de plus en plus, même au point de vue chimique, comme un cas particulier de la Physiologie de la Digestion.

VII. Suivant une conclusion déjà formulée dans un article précédent à propos des sérums antihématiques, la production, par les organismes en cours de vaccination, de substances nocives pour les microbes, ne doit pas être interprétée dans un sens téléologique. Ce n'est pas dans le but de se défendre que l'organisme élabore ces substances nocives. Il met simplement en jeu contre les microbes des capacités fonctionnelles préexistantes, aptes aussi à s'exercer, le cas échéant, vis-à-vis d'éléments non dangereux, tels les globules rouges, la caséine du lait. Les propriétés spéciales des sérums des vaccinés existent en germe dans les sérums neufs. Ceci paraît devoir concerner aussi le caractère que présentent les sérums des vaccinés, d'être spécifiques.

RAPPORT SUR LA PESTE BUBONIQUE

de NHATRANG (Annam).

Par M. le Dr YERSIN

Origine de l'épidémie. — Vers la fin de juin 1898, quelques cas de peste nous étaient signalés à Nhatrang, dans un village de pêcheurs, situé à peu de distance de l'Institut.

Le premier cas, constaté par nous, date du 28 juin, mais nos renseignements nous ont prouvé depuis l'existence de cas antérieurs dans ce même village.

Au premier abord, il était permis de supposer, et certains esprits peu bienveillants n'ont pas manqué de l'insinuer, que la peste sortait du laboratoire. Bien que notre responsabilité fût gravement engagée, nous l'avions supposé nous-même les premiers. Cependant, un examen plus approfondi des faits et des circonstances, de même que l'enquête que nous n'avons cessé de mener depuis le début de l'épidémie, et dont on verra plus loin les résultats, sont venus détruire sans peine cette première hypothèse.

Il est en effet incontestable que si l'épidémie avait eu pour cause une imprudence commise pendant nos expériences, le personnel du laboratoire aurait été tout d'abord atteint, comme cela s'est vu à Vienne récemment. Or personne, parmi les Européens ou indigènes de l'Institut, n'a été malade. Cette preuve, à la rigueur, pourrait dispenser d'en fournir d'autres.

Un incident futile, une rivalité de village suivie d'une dénonciation, nous ont mis sur la voie de l'origine réelle de l'épidémie, et nous ont amené à constater que la peste de Nhatrang est bien une importation chinoise. Les jonques chinoises, venant de Canton et Haïnam et se rendant à Singapore, descendent au commencement de l'année et font escale dans l'île du Bay-Mien où elles achètent des porcs.

Le village de Culao, assez éloigné de l'Institut, avec lequel il n'a aucun rapport et dont il est même séparé par l'estuaire

de la rivière, est en relations constantes avec ces jonques auxquelles il vend des porcs. Or ce village déclare que les premiers décès ont eut lieu parmi ses habitants au mois de mars 1898. Cette date coïncide avec le passage des jonques et la forte recrudescence de peste qui sévissait à cette époque en Chine. Il n'est donc plus permis de douter que les gens de Culao ne se soient infectés à bord des jonques chinoises, et n'aient été les véhicules du bacille.

Marche de l'épidémie. — La peste, en dehors de Culao, a eu deux foyers successifs : le premier dans le petit village de pêcheurs de Xuong-Huan du 20 juin au 25 juillet (19 cas) ; le deuxième dans les villages de Phuong-Can et Nhatrang situés à proximité du Xuong-Huan, du 1er août au 1er novembre (54 cas).

Nous avons pu très rapidement arrêter la peste dans le premier foyer, grâce à la destruction par le feu des maisons contaminées et des maisons voisines.

Si l'épidémie a duré plus longtemps dans les villages de Phuong-Can et Nhatrang, cela tient à ce que nous n'avons pu prendre cette mesure que beaucoup plus tard ; mais là aussi, elle a eu un effet immédiat.

Mode de propagation. — La peste s'est propagée lentement et régulièrement, gagnant de proche en proche, sans faire de bonds, sauf lorsqu'elle a passé du premier au deuxième foyer. Il est cependant à noter que les deux foyers ne sont distants que de 500 mètres, et que les communications entre les deux villages sont incessantes.

J'ai constaté au mois d'août la présence de rats morts de la peste dans la zone infectée, mais je n'en ai trouvé qu'un petit nombre, et, malgré la promesse de 10 cents par rat vivant ou mort qui me serait apporté, les indigènes ne m'en ont présenté aucun.

Chaque fois qu'un cas de peste nous était signalé dans une maison, nous la faisions immédiatement évacuer et les habitants étaient transportés dans une île d'isolement où ils devaient rester 15 jours.

Cette mesure n'a pas empêché la peste de se propager dans les maisons voisines de celles déjà infectées, tandis que les habitants de ces dernières, depuis le moment où ils en étaient écartés, restaient indemnes.

Ceci me paraît confirmer l'opinion émise par le Dr Simond, que la peste est peu contagieuse d'homme à homme et que l'infection doit se faire autrement.

Le Dr Simond pense que les puces y contribuent pour une large part. Je partage entièrement son avis et pense comme lui que, lors de l'évacuation des maisons, les puces restent dans la paillote et dans le sol ; mais bientôt, ne trouvant plus leur nourriture habituelle, elles gagnent les maisons voisines dans lesquelles elles portent l'infection.

Il ne suffit pas toujours, pour qu'un village soit infecté, qu'un homme malade de la peste vienne y mourir. Ce qui tendrait à le prouver, c'est que deux pestiférés de Nhatrang sont allés mourir à Cho-Moï, village important éloigné de 4 kilomètres, et que, après l'incendie des maisons où ils avaient séjourné, le village est resté indemne jusqu'à aujourd'hui.

Symptômes de la maladie. — La peste, chez les Annamites, présente les mêmes caractères que chez les Chinois et les Indiens. La maladie typique débute brusquement par un frisson, suivi d'une haute température (39 à 41°).

Le malade, pris de vertige, a la démarche d'une personne ivre. Il éprouve une grande lassitude, de la céphalalgie : les conjonctives sont injectées, la respiration accélérée, le pouls fréquent. Le malade a des vomissements, il est plutôt constipé.

Le bubon paraît dès les premières heures et se développe très rapidement ; il est en général unique, siège par ordre de fréquence à l'aîne, à l'aisselle, au cou. Il est toujours très douloureux au toucher. Il peut rester limité au groupe ganglionnaire ou être accompagné d'un empâtement diffus de la région.

Le deuxième jour, la température reste élevée, la respiration devient plus anxieuse et le pouls plus fréquent : le malade a souvent du délire. Le bubon grossit et atteint souvent la dimension d'un œuf de pigeon.

Le troisième jour, la fréquence du pouls est excessive (plus de 140 pulsations à la minute) : le malade est angoissé. Le bubon a atteint la dimension d'un œuf de poule.

La mort arrive subitement par arrêt de la respiration.

Le cas typique de peste, tel que nous venons de le décrire, est exceptionnel. En réalité, on observe une grande variété dans les symptômes, si bien que dans plus de la moitié des cas, le

diagnostic n'est possible qu'après la mort, lors de la recherche microscopique du bacille caractéristique de la peste.

Si nous étudions la statistique des 72 cas de peste observés à Nhatrang, nous voyons qu'il y a eu 38 cas avec bubons et 34 cas sans bubons. Donc, près de la moitié des cas ne présentaient pas le bubon caractéristique.

Dans les cas sans bubons, la maladie évolue soit comme une pneumonie simple, soit comme un accès pernicieux, sans qu'il y ait possibilité de faire le diagnostic pendant la vie.

Le symptôme le plus constant est la fièvre ; la température dépasse en général 39°, mais non toujours. La céphalalgie et le vertige sont aussi très fréquents, ainsi que les vomissements et l'anxiété respiratoire. Dans la pneumonie pesteuse, le malade a très souvent des hémoptysies, la diarrhée est toujours rare.

Il est certain que ces symptômes sont insuffisants, s'ils ne sont pas très accusés, pour l'établissement du diagnostic. On voit souvent des gens, peu malades en apparence, qui meurent subitement, quelquefois au milieu de leur travail. Ce sont les cas de peste foudroyants, dans lesquels la maladie a évolué insidieusement et sans symptômes extérieurs.

Nous avons eu plusieurs cas semblables à Nhatrang ; j'en citerai deux comme exemples. Le 9 août, un vieux pêcheur de 60 ans s'embarque sur sa jonque pour aller pêcher en mer. Vers 9 heures du matin, il dit se sentir indisposé et se roule dans sa natte. Une heure après, ses camarades veulent l'appeler pour manger : il était mort. A l'autopsie, j'ai constaté la peste.

Le 4 septembre, une femme de 40 ans, marchande dans le village, reçoit deux clientes; elle les sert, cause un moment, puis soudain dit qu'elle se sent indisposée et qu'elle a des vertiges. Elle s'étend sur son lit et meurt aussitôt! J'ai également constaté la peste à l'autopsie.

Chez les vieillards, la peste a le plus souvent une marche insidieuse, sans symptômes nets. La température est irrégulière, tantôt très élevée, tantôt normale; le bubon manque le plus souvent. La mort arrive tardivement (5e ou 6e jour), et le diagnostic n'est possible qu'à l'autopsie.

Diagnostic bactériologique. — Le bacille de la peste existe toujours dans les ganglions lymphatiques, même dans les cas de peste sans bubons, pneumonies et autres formes. Il est très

facile, après la mort, d'extirper du cadavre un ganglion à l'aine, à l'aisselle ou au cou. Cette opération peut être faite en moins d'une minute et n'effraie pas les indigènes, qui ne s'y sont jamais opposés.

Le ganglion extirpé est examiné au microscope et ensemencé sur de la gélose nutritive.

En vue de l'examen microscopique, le mode d'opérer le plus simple est de couper le ganglion avec une paire de ciseaux flambés, et de frotter la surface coupée sur une lame de verre.

Dès que le « frottis » est desséché, on le fixe au moyen de l'alcool-éther et on le colore en quelques secondes avec du violet de gentiane. La préparation, lavée et séchée, est examinée au microscope avec un objectif à immersion. Le bacille de la peste se reconnaît aisément à sa forme ovoïde et à ses pôles colorés.

En général, l'examen microscopique suffit dans les cas où il existe une quantité considérable de bacilles de la peste. Mais il peut arriver que ceux-ci soient rares ou qu'il y ait doute. Dans ce cas, il faudra ensemencer avec pureté de la pulpe de ganglion sur quelques tubes de gélose nutritive. S'il y a de la peste, en 24 à 36 heures, il se développera à la surface de la gélose un grand nombre de petites colonies translucides, que l'on reconnaîtra être de la peste à l'examen microscopique.

Il est bon de se rappeler que le microbe de la peste ne prend pas le Gram, et d'essayer toujours cette réaction colorante pour assurer le diagnostic.

Si l'on veut diagnostiquer plus sûrement encore la maladie, on inoculera une souris avec la pulpe du ganglion ou avec la culture sur gélose ; cette inoculation se fait très simplement au moyen d'un fil de platine enduit à son extrémité de la substance à inoculer qui est introduite sous la peau de la cuisse par une petite boutonnière faite avec des ciseaux.

Si le microbe inoculé est celui de la peste, la souris mourra en 2 à 4 jours, et à son autopsie on retrouvera le microbe caractéristique dans le sang et la rate.

Ce procédé de diagnostic par l'examen bactériologique d'un ganglion d'une personne morte nous a été de la plus grande utilité, et nous pouvons le recommander pour tous les cas où il n'y a pas de bubons et où il est utile d'être fixé sur la cause de la mort.

Mortalité et traitement. — La peste s'est montrée excessivement meurtrière chez les Annamites.

Sur 72 cas de peste, 39 personnes chez lesquelles la maladie a évolué normalement ou qui n'ont été traitées que par des médecins indigènes sont mortes sans exception.

Les 33 autres cas ont pu être traités par le sérum, quelquefois dans de bonnes conditions, mais le plus souvent quelques heures seulement avant la mort. Malgré cela, nous avons obtenu 19 guérisons et 14 décès, ce qui fait une mortalité de 42 0/0 chez les traités.

Ainsi, d'une part, 100 pour 100 de mortalité chez les non traités; de l'autre, 42 0/0 chez les malades qui ont reçu du sérum. Ces chiffres confirment les résultats que j'avais obtenus en Chine en 1896. Si la proportion de morts est encore considérable chez les Annamites, cela tient à leur peu de résistance, que je n'ai jamais vue si faible ni en Chine ni aux Indes.

Voici l'histoire de quelques malades traités par le sérum :

1° *Qui*, pêcheur annamite de 27 ans, pris de peste le 9 *juillet* dans la soirée. Le malade nous est présenté le 10 juillet à 9 heures du matin : sa température est de 38°,1; il a de la céphalalgie, des éblouissements, il éprouve une grande lassitude ; l'aine gauche, région crurale, est douloureuse au toucher. Les ganglions y sont un peu engorgés. On injecte 20 c. c. de sérum.

A trois heures de l'après-midi, la T. est de 38°,2, les ganglions de l'aine gauche ont un peu augmenté; on injecte encore 20 c. c. de sérum.

11 *juillet*. — A 7 heures du matin, T. 38°,9; le bubon, qui a beaucoup augmenté, est très douloureux; à 5 h. soir, T. 40°,3. On injecte 10 c. c. de sérum.

12 *juillet*. — A 7 heures du matin, T. 38°,8. Bubon toujours gros et douloureux. On injecte 20 c. c. de sérum. A 5 h. soir, T. 38°,5. Bubon toujours gros et douloureux, mais il est assez bien délimité.

13 *juillet*. — A 8 heures matin, T. 37°,7. Très bon état général, bubon moins douloureux. A 5 heures soir, T. 38°,6, bon état général, appétit.

14 *juillet*. — A 8 heures matin, T. 36°,7 ; le malade est seulement gêné par son bubon, qui est gros comme un œuf de poule et qui suppurera.

La température est dès lors normale.

Le 18 *juillet*, le bubon est suppuré; le malade entre en convalescence, mais celle-ci dure plus de deux mois, car lorsqu'un bubon pesteux suppure, il s'y forme presque toujours un bourbillon qui met d'autant plus de temps à s'éliminer et à se cicatriser qu'il est plus considérable.

Le cas suivant est un exemple de peste à bubon guéri sans suppuration :

2° *Xieng*, fille annamite de 17 ans, prise de peste le 17 *août* au matin. Nous voyons la malade à midi. Sa température est de 39°,8. Accablement, vertige, vomissements. Bubon axillaire gauche très douloureux, gros comme une noisette. Injecté 30 c. c. de sérum. A 5 heures du soir, T. 38°,6; état général meilleur. Injecté encore 10 c. c. sérum.

18 *août*, — 8 heures matin, T. 36°,8; état général excellent; le bubon a beaucoup diminué. A 5 heures soir, température normale; le bubon continue à diminuer.

19 *août*. — Température normale, bubon presque disparu. La malade peut être considérée comme guérie.

Histoire d'un malade mort malgré le traitement.

3° *Ham*, homme annamite de 21 ans, est pris de peste dans la nuit du 18 au 19 *août*.

19 *août*. Nous voyons le malade à 6 heures du matin, T. 39°,9. Le malade délire et a des soubresauts nerveux. Bubon crural gauche très douloureux. Injecté 40 c. c. de sérum. A 5 heures du soir, T. 39°,5; le bubon a beaucoup grossi et n'est pas bien limité. Le malade a des vomissements, il est inconscient. Injecté 20 c. c. de sérum.

20 *août*. — A 8 heures du matin, T. 38°,1. Amélioration très notable; le malade a repris connaissance, mais le bubon ne diminue pas. A 5 heures soir, T. 38°,8.

21 *août*. — A 8 heures matin, T. 38°,1; l'état général est bon, mais le bubon devient de plus en plus gros et diffus. A 5 heures soir, la température monte à 39°,5; la respiration est anxieuse, le malade agité. Il meurt subitement à 6 heures du soir.

Exemple d'un cas de peste sans bubons guéri par le sérum.

4° *Lun*, femme du cas n° 1, âgée de 21 ans, prise de peste, le même jour que son mari, le 9 juillet dans la soirée.

10 *juillet*. — Nous voyons la malade à 9 heures du matin : grande lassitude, vertige, céphalalgie. T. 38°,9. Aucun bubon. On injecte 20 c. c. de sérum. A 4 heures du soir, T. 40°,1, la malade est très abattue, somnolente; céphalalgie violente. Injecté 20 c. c. sérum.

11 *juillet*. — A 7 heures matin, T. 38°,0. La nuit a été bonne; état général satisfaisant. Injecté encore 10 c. c. de sérum. A 5 heures soir, T. 38°,7.

12 *juillet*. — A 7 heures matin, T. 38°,3, la malade va beaucoup mieux. Injecté encore 10 c. c. de sérum. A 5 heures soir, T. 38°,7.

13 *juillet*. — A 7 heures matin, T. 39°,5. Rien dans l'état général n'explique cette haute température. A 5 heures soir, T. 39°,8; bon appétit, la malade dit se sentir très bien.

14 *juillet*. — A 7 heures matin, T. 37°,4. A 5 heures soir, T. 37°,8.

15 *juillet*. —La température est normale; la malade peut être considérée comme guérie.

Le tableau ci-dessous donne quelques renseignements statistiques sur la proportion des Annamites atteints par rapport au sexe et à l'âge.

HOMMES	Enfants	12	32
	Adultes	15	
	Vieillards	5	
FEMMES	Enfants	8	40
	Adultes	21	
	Vieillards	11	
TOTAL			72

Si les femmes ont été atteintes plus que les hommes, cela tient à leur genre de vie qui les retient davantage dans les maisons, où nous avons vu que réside l'agent infectieux, tandis que les hommes vivent, la plus grande partie du temps, sur leurs jonques de pêche.

Mesures générales contre l'épidémie. — Dès que l'épidémie a été nettement constatée dans le village de Xuong-Huan, nous avons pris, outre les mesures quarantenaires, les dispositions suivantes :

Obligation aux notables du village de venir nous avertir de tout cas de maladie se produisant dans le village.

Si nous reconnaissions la peste, nous faisions de suite évacuer la population de la maison infectée dans une île où nous avions établi un lazaret.

Le malade était placé dans une petite maison en bambou et paillote, avec une personne de sa famille pour le soigner ; les autres habitants de la maison étaient inoculés préventivement avec le sérum et réunis dans une paillote éloignée du lazaret-hôpital.

La maison infectée était aussitôt brûlée, ainsi que les maisons voisines dont les habitants étaient également isolés au lazaret pour une quinzaine de jours.

Nous avons largement pratiqué les inoculations préventives avec le sérum, et nous avons pu constater qu'aucune de ces personnes n'a été atteinte.

Grâce à ces mesures radicales, la peste s'éteignit très vite dans le village de Xuong-Huan ; mais ce qui était à prévoir arriva.

Un certain nombre d'habitants, pour éviter l'isolement au lazaret, s'étaient réfugiés dans le village voisin. L'un d'eux meurt de la peste. On l'enterre clandestinement pour éviter l'incendie de la maison, et nous n'avons su l'existence de ce nouveau foyer que lorsque plusieurs personnes étaient déjà mortes dans des maisons différentes.

Il aurait fallu, à ce moment, brûler une centaine de maisons, mais il était à craindre que la panique ne se mît dans le village et que les habitants ne portassent l'infection au loin.

Nous avons donc essayé de faire seulement évacuer et fermer les maisons infectées et d'en isoler les habitants.

L'expérience nous a montré que cette mesure était insuffisante, puisque la peste continuait à s'étendre aux maisons voisines de celles évacuées.

Il n'y avait dès lors plus à hésiter; un nouveau village a été construit à deux kilomètres de la zone infectée, et la population de Phuong-Can et de Nhatrang y a été transportée en trois séries, après que chacune d'elles eût séjourné pendant 15 jours au lazaret. Le village infecté a été entièrement brûlé et défense a été faite aux habitants d'y reconstruire des maisons pendant une année au moins.

La peste a été ainsi instantanément enrayée, ce qui prouverait que cette mesure était la seule absolument efficace.

Conclusions. — La race annamite est aussi susceptible de contracter la peste que les races chinoise et hindoue. Les Annamites m'ont même paru plus sensibles à cette maladie, et la mortalité a été chez eux proportionnellement plus forte que partout ailleurs.

Il y a eu à Nhatrang, du 15 juin au 31 octobre 1898, 72 cas de peste dont 53 décès, ce qui donne comme mortalité générale 73 0/0.

Ce chiffre est inférieur à ceux des épidémies de la Chine et de l'Inde, qui ont causé 85 à 90 0/0 de mortalité. L'écart entre ces deux pourcentages est dû au traitement par le sérum et à la guérison d'un certain nombre de malades.

Sur 33 personnes traitées, nous en avons guéri 19 et perdu 14 : *mortalité*, 42 0/0.

Sur 39 personnes non traitées, toutes sont mortes sans exception : *mortalité*, 100 0/0.

Les mesures générales qui nous ont paru nécessaires pour enrayer l'épidémie ont été les suivantes :

1° Destruction par le feu de toutes les maisons contaminées et d'une large zone de maisons saines tout autour;

2° Désinfection soigneuse au crésyl, ou mieux à l'étuve, de

tous les effets que les habitants des maisons contaminées et des maisons saines voisines ont emportés avec eux;

3° Isolement immédiat des malades et de leur famille dans un lazaret;

4° Transport de la population de la zone infectée dans un village nouvellement construit à cet effet;

5° Interdiction, au moins pendant une année, faite aux habitants, de reconstruire leurs maisons sur l'emplacement de l'ancien village contaminé;

6° Déclaration de tous les décès qui se produisent dans les villages voisins. Si l'un d'eux paraît tant soit peu suspect, le cadavre sera visité et on enlèvera un ganglion pour l'examen bactériologique;

7° Recommandation expresse à tous les villages de ne pas recevoir les habitants de la zone infectée, ni leurs effets d'habillement ou de mobilier pendant la durée de l'épidémie;

8° Établissement dans le nouveau village d'un service de surveillance très sévère, afin de pouvoir être averti de suite de toute indisposition ou maladie qui s'y produirait.

Je crois qu'une excellente mesure serait la destruction des rats et souris dans les villages voisins de la zone infectée, puisque nous savons aujourd'hui que la peste est transportée principalement par ces rongeurs et leurs parasites.

J'estime que si un nouveau foyer de peste se déclarait en quelque autre point de l'Indo-Chine, ce qui est de plus en plus à craindre, il ne faudrait pas hésiter à prendre les mesures que je viens d'énumérer, à l'exception peut-être de l'incendie des maisons.

Si cette précaution est excellente par elle-même, elle offre par contre le danger d'effrayer et de nous aliéner la population, qui évitera par tous les moyens, et surtout par la dissimulation des cas et par la fuite, la perte de quelques hardes auxquelles elle tient d'autant plus qu'elles sont plus usagées, et qui transportera ainsi l'épidémie dans d'autres villages.

L'indigène n'a d'ailleurs jamais compris la gravité de cette maladie, qu'il ignorait jusqu'à ce jour, et dont le nom n'existait même pas. Malgré toutes les instructions, les explications et les exemples des cas traités sous leurs yeux, les Annamites attribuent encore aujourd'hui les décès causés par la peste à l'in-

fluence surnaturelle des Génies irrités : la pagode de Nhatrang étant habitée provisoirement par le sous-préfet indigène, les habitants sont venus déclarer à l'autorité française que le Génie du village, mécontent de cette usurpation, avait déchaîné cette nouvelle maladie. Il a fallu s'incliner devant cette croyance et pourvoir le sous-préfet d'un nouveau local. L'épidémie n'en a pas moins continué. D'autres décès ont eu pour cause la colère de la déesse Baghavati, dont l'esprit serait caché dans un antique monument chame, que tout annamite révère et craint.

C'est d'ailleurs par des sortilèges et des incantations que les médecins annamites prétendent combattre la peste, lorsque leurs médecines sont restées impuissantes.

La superstition est donc un facteur dont nous devons tenir compte dans une certaine mesure pour l'application de nos prescriptions sanitaires.

A l'heure actuelle, tous nos efforts doivent tendre à empêcher la peste de s'implanter en Indo-Chine. L'Inde anglaise nous offre un exemple des ravages que peut causer cette maladie le jour où elle a pu s'établir dans un pays et des difficultés insurmontables que l'on éprouve alors à arrêter sa marche meurtrière.

Il nous est toutefois permis d'espérer que la science n'a pas dit son dernier mot. Nos méthodes se perfectionnent de jour en jour, et il n'est pas impossible que nous arrivions à être maître de la peste comme Jenner l'a été de la variole.

Nhatrang, 26 janvier 1899.

RECHERCHES
SUR LA MARCHE DE L'IMMUNISATION ACTIVE
CONTRE LA DIPHTÉRIE

Par C. J. SALOMONSEN et TH. MADSEN
(Travail du laboratoire de bactériologie médicale de l'Université de Copenhague.)

DEUXIÈME MÉMOIRE

Il y a maintenant quatre ans qu'on a commencé dans les différents pays de produire en grand le sérum antidiphtérique : on a pourtant publié encore très peu de communications précises touchant les variations de la force antitoxique durant l'immunisation des chevaux.

MM. *Brieger* et *Ehrlich* ont tracé la première « courbe d'antitoxine » en se basant sur une série continue de mesures de la force antitoxique du sang chez une chèvre qu'on avait activement immunisée contre le tétanos. Cette courbe était unique dans la science jusqu'à la publication de notre mémoire publié dans ces *Annales* en 1897[1]. Nous avons continué nos expériences autant que les circonstances nous l'ont permis.

Quand nous commençâmes en Danemark la production de sérum antidiphtérique à la fin de 1894[2], le laboratoire de *M. Roux* à l'Institut Pasteur fut le seul qui sans réserve mit son expérience à la disposition de tous les bactériologistes, communiqua tous les détails de la fabrication, fournit aux autres laboratoires des cultures toxigènes, en tout fit son possible et pour faciliter la fabrication du sérum antidiphtérique, et pour permettre aux médecins et aux malades de profiter du nouveau traitement.

Aussi, au commencement, avons-nous suivi exactement les

1. Salomonsen et Madsen. *Recherches sur la marche de l'immunisation active contre la diphtérie.*

2. Le gouvernement et les Chambres ayant accordé le crédit nécessaire, la fabrication fut aussitôt commencée, et depuis l'été 1895 des quantités considérables de sérum antidiphtérique ont été distribuées gratuitement à tous les médecins et à tous les hôpitaux de Danemark. (Voir *C. J. Salomonsen :* Fremstilling og Uddeling af antidifterisk Serum i Danmark, Copenhague 1897.)

indications de MM. Roux et Martin pour la fabrication, le dosage du poison, etc. : nous avons fait les grandes saignées à peu près chaque mois, et ce fut exceptionnellement que nous avons fait des déterminations de la force antitoxique du sérum hors des jours de saignée. Des observations ainsi recueillies, nous ne mentionnerons ici que *la baisse antitoxique habituelle* chez les chevaux immunisés. Nous appelons ainsi la tendance à une baisse permanente de la force antidiphtérique du sérum chez les chevaux immunisés depuis longtemps, et en conséquence traités alternativement par des injections de poison et des saignées d'après la méthode de MM. Roux et Martin.

Nos quatre premiers chevaux ont montré très nettement ce phénomène. Même par l'emploi continuel de doses relativement considérables (800-1000 c. c.) de poison diphtérique puissant, nous n'avons pu éviter des baisses importantes et continuelles dans la force antitoxique du sang. Quand, pour la première fois, nous observâmes ce fait, nous fûmes naturellement conduits à en chercher la cause.

Cette baisse habituelle est-elle due à ce que *l'antitoxine disparaît* de l'organisme par une sécrétion plus rapide ou plus abondante qu'à l'ordinaire? ou est-elle due à une *diminution du pouvoir antitoxigène* du cheval?

La première hypothèse était assez plausible, puisque les travaux de plusieurs savants (*Roux* et *Behring* entre autres) avaient constaté que l'antitoxine se trouve dans différentes sécrétions.

L'explication du problème n'est pourtant pas à chercher dans ce fait. D'abord une comparaison des quantités d'antitoxine dans le sang et dans les sécrétions nous montra que cette dernière *quantité est trop petite* pour expliquer la baisse en question.

Puis, s'il y avait, pendant la baisse du pouvoir antitoxique du sang, une quantité plus grande d'antitoxine éliminée, les oscillations de la force antitoxique des sécrétions devaient être en rapport inverse avec celles du sang. Dans notre mémoire cité, nous avons déjà montré que tel n'est pas le cas quant au *lait*. Au contraire les variations de la force antitoxique du lait suivent très exactement les variations correspondantes du sang pendant une période de 43 jours. Quant à l'*urine*, à la *salive* et à la *sueur*, nous avons tâché d'établir une comparaison analogue pour deux chevaux A et B (Voir le tableau I).

TABLEAU I

JOUR d'expérience.	QUANTITÉ du POISON injecté en c. c.	*UNITÉS D'IMMUNISATION PAR CENT. CUBE.*							
		CHEVAL A				CHEVAL B			
		SANG	SALIVE	SUEUR	URINE	SANG	SALIVE	SUEUR	URINE
1	1								
8	5								
17	10								
21	20								
27	40								
37	70	20				25			
46	100								
52	200								
62	400	40				75			
78		45				110			
83		40				110			
91	800	35	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{30}$	$<\frac{1}{160}$	110	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$<\frac{1}{300}$
92		30							
93		25	$<\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$<\frac{1}{300}$	90	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	
95		20	$<\frac{1}{160}$	$<\frac{1}{300}$		100			
97		30				110	$\frac{1}{10}$		
98		35	$\frac{1}{160}$	$<\frac{1}{300}$					
100		40		$\frac{1}{20}$		145	$\frac{1}{10}$		
103		35	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{40}$		160			
106		35				165			
108						165			
111		30	$\frac{1}{30}$	$\frac{1}{30}$		165			
113		30				165			
116						150			
118		30				140			

La force antitoxique de l'*urine* se montre très faible, presque imperceptible. L'étude des deux autres sécrétions a été plus difficile, vu leur manque de stérilité et leur faible pouvoir antitoxique. Néanmoins on a réussi à démontrer *une concordance dans les variations du sang et des deux sécrétions mentionnées* pour les deux chevaux examinés. Durant la baisse de la force antitoxique du sang, celle des sécrétions diminuait à si haut degré, qu'elle était difficile à mesurer.

On voit, par ce qui précède, que *le rapport entre la force antitoxique des sécrétions et celle du sang* se conserve à peu près constant pendant quelque temps. Néanmoins ce rapport n'est point toujours constant, même pour le même animal. Nous en avons trouvé un exemple dans la jument étudiée dans notre premier travail, pour laquelle le rapport entre la force antitoxique du lait et du sang fut, une semaine après le part, comme 1 : 90, et plus tard, comme 1 : 200. Pour les chevaux A et B, le rapport correspondant à la salive et à la sueur fut comme 1 : 1.000 ou 1.500 pendant les recherches en question ; plus tard le rapport diminuait beaucoup.

Restait donc à se demander *si la baisse habituelle de l'antitoxine indique une diminution de la force antitoxigène* chez les animaux employés longtemps aux expériences?

Une réponse sûre ne peut être obtenue que par une série de recherches sur les variations de la puissance antidiphtérique du sang provoquées par une injection de poison.

Nous avons entrepris cette recherche sur un cheval dont l'immunisation avait été commencée depuis vingt et un mois, et qui avait été saigné 10 fois en tout.

La figure 1 donne une représentation graphique du résultat, les chiffres des ordonnées indiquant les unités d'immunisation par c. c., ceux des abscisses les jours d'expériences.

La force antidiphtérique ayant été constante et de 45 pendant une semaine, le cheval reçut 1.000 c. c. de toxine de force telle que 0.1 c. c. tua un cobaye pesant 500 gr. en environ 48 heures. La conséquence fut une baisse primaire à 25 pendant les deux jours suivants, puis une hausse jusqu'à 50, durant le même intervalle ; après cela la force antitoxique baissa jusqu'à 45 où elle se conserva constante dans les jours suivants.

Il résulte donc de cette expérience que 1.000 c. c. de fort

poison n'ont pu produire une augmentation considérable de la force antidiphtérique du sang, pas même passagère. Dans ce cas, on ne saurait douter que *la faculté antitoxigène de l'organisme ne soit affaiblie* d'une manière évidente.

Qu'est-ce qui produit cet affaiblissement? Sans doute *l'intoxication répétée* et les *saignées abondantes* y jouent un rôle.

Quant aux *injections de poison*, nous avons déjà communiqué cette observation que trois injections consécutives de la même quantité de poison donnaient des résultats toujours plus faibles

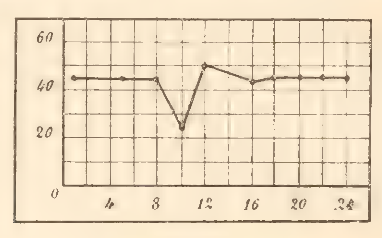


Fig. 1

et pour la hausse et pour la baisse de la force antidiphtérique du sang. Le même phénomène s'est montré plus tard chez un autre cheval, quoique à un degré moins prononcé. Dans notre travail cité, nous avons tâché de montrer que l'explication est probablement à chercher dans une accoutumance vis-à-vis du poison. qui en même temps diminue la sensibilité pour ses effets nuisibles et affaiblit la puissance de sécrétion de l'antitoxine. En outre, on sait que plusieurs savants sont d'avis que, pour produire du sérum de grande force antitoxique, il est nécessaire d'augmenter les doses de poison *avec une extrême lenteur* et avec beaucoup de précautions, en s'efforçant d'éviter des symptômes morbides. En considérant tout ceci, on est forcément conduit à supposer que l'injection de poison repétée contribue à affaiblir la faculté antitoxigène.

Quant aux *saignées*, nos expériences ne laissent aucun doute sur leurs effets analogues :

1° Les grandes saignées sont immédiatement suivies de si fortes baisses de la force antitoxique, qu'elles *ne peuvent pas être expliquées simplement par la dilution du sang*, mais doivent être considérées comme des conséquences de l'influence nuisible sur la production de l'antitoxine, due à l'anémie aiguë.

2° Nous avons observé une baisse prononcée et définitive de la force antitoxique du sang après chaque grande saignée, et cela que la baisse soit progressive (voir ces *Annales*, t. XII, p. 768) ou que l'animal regagne son équilibre antitoxique (voir la courbe, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XI, p. 319.)

Ces recherches sur la baisse antitoxique habituelle n'ont pas seulement une valeur pratique, elles s'accordent avec la série d'observations qui montrent que le degré d'immunité d'un organisme ne peut pas être mesuré simplement par sa quantité totale d'antitoxine, comme on l'a supposé immédiatement après la découverte de M. *Behring*. Ce fut ce savant lui-même qui réfuta cette supposition en établissant l'idée de « l'immunité de tissu ». Sa conception s'accorde avec les travaux de M. *Metchnikoff* sur le choléra, avec ceux de MM. *Roux* et *Vaillard* sur le tétanos, et avec ceux de M. *Pfeiffer* sur le typhus, quant aux pouvoirs bactéricide et antitoxique.

Le même phénomène reparaît chez nos chevaux, qui n'ont jamais montré de sensibilité augmentée pour la toxine antidiphtérique, même si la force du sérum avait diminué considérablement : c'était plutôt le contraire.

Nous avons fait ressortir plus haut la grande importance que pourraient présenter les courbes d'antitoxine, pour déterminer les doses convenables de toxine, leur juste gradation, les intervalles entre chaque injection, et pour dire quel jour, après la dernière injection, il faut saigner.

En outre, ces courbes d'antitoxine ont un grand intérêt scientifique, comme pouvant conduire à une conception plus profonde du mécanisme très compliqué de l'immunisation active.

Pour résoudre toutes ces questions, il est nécessaire de disposer de *nombreuses* courbes d'antitoxine, car les différents chevaux montrent de *grandes différences individuelles* quant à leur faculté antitoxigène. Cette observation a été faite par tous ceux qui se sont occupés de la fabrication de sérum.

Deux de nos courbes offrent un très bon exemple de ces différences individuelles. Elles ont rapport à deux chevaux A et B, qui furent immunisés exactement de la même manière par des doses de même grandeur du même poison injectées simultanément. Les deux chevaux différaient considérablement : A était une jument petite, vive, grise, âgée de douze ans et pesant

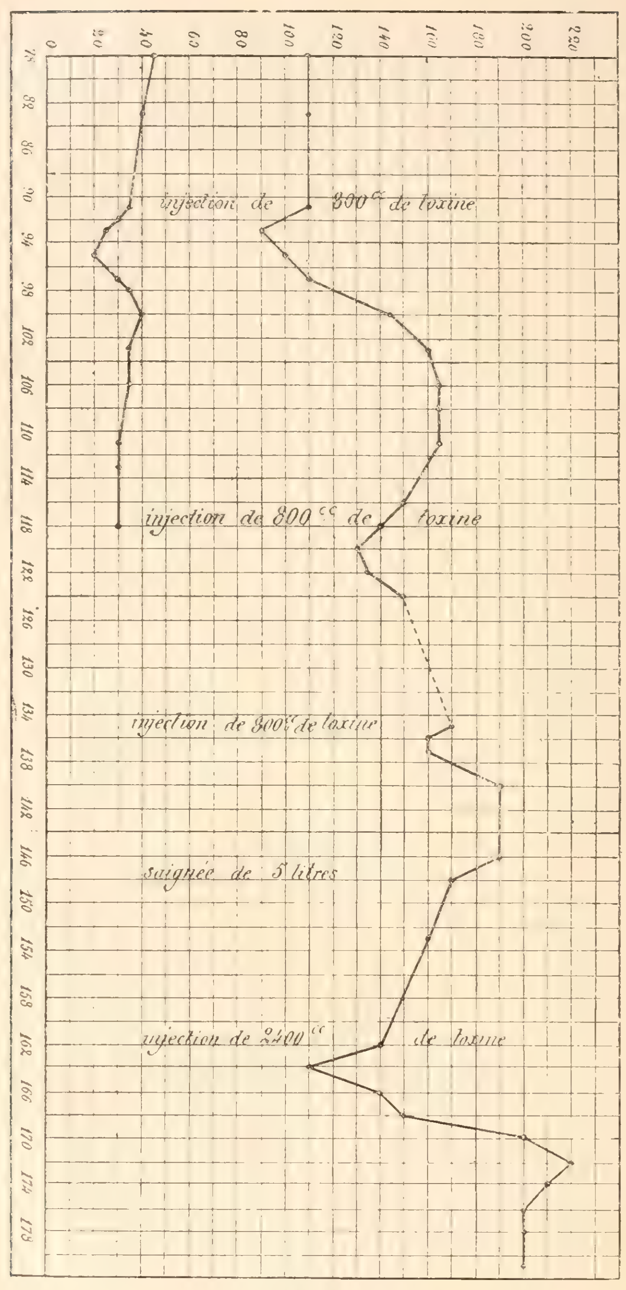

0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
78
82
86
90
94
98
102
106
110
114
118
122
126
130
134
138
142
146
150
154
158
162
166
170
174
178
injection de 800cc de toxine
injection de 800cc de toxine
injection de 800cc de toxine
saignée de 5 litres
injection de 2400cc de toxine

Fig. 2.

450 kilogs. tandis que B était un hongre, grand, lourd, brun, âgé de sept ans et pesant 575 kilogs. Les mesures comparatives s'étendaient sur un laps de temps de 118 jours.

Déjà les mensurations entreprises pendant les premiers 77 jours nous ont montré la différence entre la manière de réagir des deux chevaux; mais encore plus prononcée fut la différence entre la 78e et la 118e journée, comme elle saute aux yeux dans la représentation graphique ci-contre. (Fig. 2.)

Après l'introduction de la même quantité de poison en même temps, le sang de A n'atteint que *10* tandis que celui de B s'élève à un maximum de *165*. Nous retrouvons donc chez le cheval A la même forme de courbe que nous avons observée chez cet autre cheval dont nous avons mentionné auparavant la baisse d'antitoxine habituelle. (Fig. 1.)

Ce n'est pas seulement dans leur pouvoir antitoxigène (c.-à-d. dans la *hauteur* absolue des ordonnées des courbes) que les chevaux montrent des différences individuelles et évidentes. — La *forme* de la courbe d'antitoxine peut de même varier beaucoup pour des chevaux immunisés tout à fait de la même manière. Nous allons citer comme exemples les courbes suivantes :

1° la courbe indiquée par nous dans ces *Annales* (t. XI, p. 319) ;
2° — — pour le cheval A (Fig. 2) ;
3° — — — — — B (Fig. 2).

qui montrent la réaction de trois chevaux immunisés après *une seule* injection d'une *quantité considérable de poison*.

Un coup d'œil sur ces figures nous apprend que pour la courbe 1°, il y a *à peu près égalité entre chaque abaissement et la surélévation suivante;*

Pour la courbe 2° (cheval B), une *surélévation considérable* suivait toujours après un *petit abaissement ;*

Enfin pour la courbe 3° (cheval A), on obtenait au contraire un *abaissement* relativement *grand* (15) et une *surélévation minime* (5).

D'ailleurs il y a une certaine *analogie* à d'autres égards entre la manière de réagir des trois chevaux :

1° Nous avons déjà mentionné que deux des courbes montrent une *diminution successive des réactions* à chaque nouvelle injection de la même quantité de poison;

2° *Le moment de la force maximun* de l'antitoxine pour les

trois chevaux arrive à peu près 9 *à* 12 *jours* après l'injection du poison, malgré la forme très différente des courbes.

Pour la technique de la fabrication du sérum antitoxique, il est très important de pouvoir déterminer l'époque où la force antitoxique s'est élevée à son maximum.

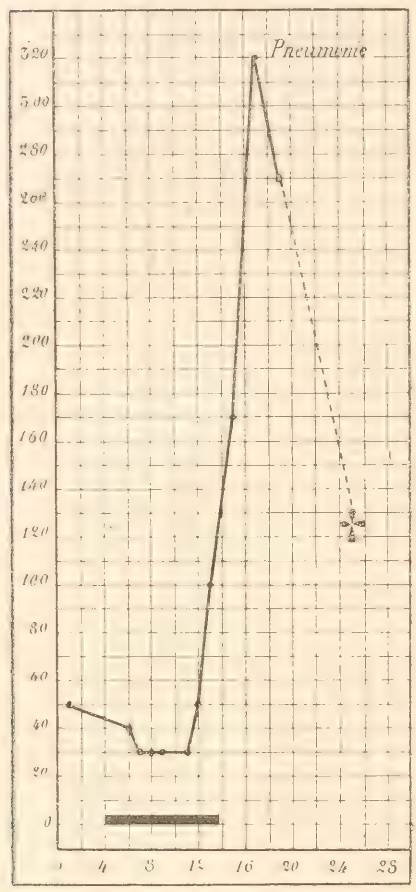


Fig. 3

Le temps indiqué ci-dessus (9-12 jours) ne vaut bien entendu que pour la forme d'immunisation employée : *injection sous-cutanée d'une seule grande quantité de poison. Pour chaque nouveau procédé on doit en déterminer le moment du maximum.* Nous allons éclaircir cette question en communiquant les expériences suivantes, dont le but a été d'examiner la manière de réagir contre *une série d'injections fortes se suivant à courts intervalles*

1o Notre première expérience de cette espèce fut exécutée avec un cheval auquel on injecta sous la peau, durant 8 jours consécutifs, journellement 200 grammes de poison diphtérique [1].

Au commencement de l'expérience, la force antitoxique du sérum fut environ 50. Au 6e jour après la dernière injection, la force du sérum fut 140; mais à la saignée entreprise 5 jours plus tard, le sérum retiré du cheval était réduit à 70. Cette observation nous a fait examiner plus systématiquement la question de l'influence qu'exercent sur la force

1. La force du poison diphtérique employé dans cette expérience et celles qui suivent fut telle que 0,01 c. c. tua un cobaye pesant 250 grammes en environ 4 jours.

antitoxique de fortes injections se suivant *à de courts intervalles*.

2° Chez un cheval, dont la force (v. Fig. 3) du sérum était descendue d'environ 50 jusqu'à 40 dans les 5 jours précédant immédiatement les injections, on injecta sous la peau journellement pendant 8 jours 500 c. c. de poison. Les jours d'injection sont indiqués sur la figure par une grosse ligne noire.

La première injection causa une baisse depuis 40 jusqu'à 30. Malgré l'introduction journalière de grandes quantités de poison la force du sérum fut constante pendant les 5 jours suivants, et pendant les deux derniers jours elle s'accrut même de 30 jusqu'à 100. Durant les 4 jours suivants elle atteignit même 320 !

A cette époque le cheval eut une pneumonie et mourut après une maladie de 8 jours, avec une baisse rapide de la force antitoxique.

3° Le cheval dont la première courbe d'antitoxine est reproduite sur la figure 4 montra, dans la dernière semaine avant les injections, une force de sérum de 60, qui tomba plus tard à 50. Pendant les 9 jours suivants, l'animal reçut 8 injections de

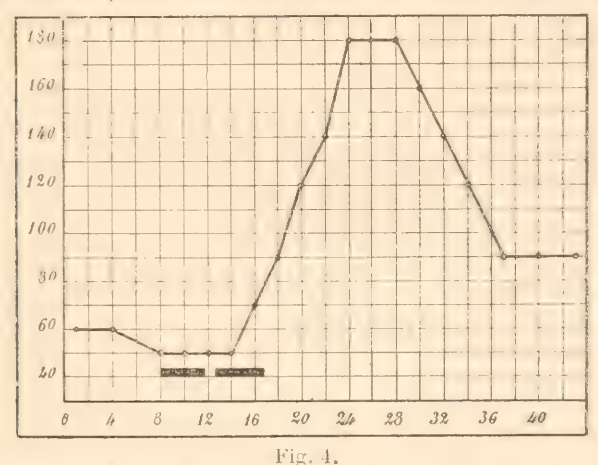


Fig. 4.

200 c. c. de poison. Néanmoins la force antitoxique fut constante les 7 premiers jours d'injection, mais après, pendant l'intervalle du 7e jusqu'au 9e jour après l'injection, elle monta à 70, et pendant les 8 jours suivants elle atteignit même 180. A ce point la force se tint invariable pendant 4 jours et puis elle baissa à 140 et au-dessous.

Pendant la période suivante, le même cheval fut injecté 2 fois de la même manière, avec saignées consécutives. 5 mois après

l'expérience, on injecta de nouveau 200 c. c. de poison pendant 4 jours et puis, après un intervalle de même durée, encore une fois pendant 4 jours 200 c. c. de poison.

La courbe (Fig 5) montre que les variations sont alors bien plus petites que dans l'expérience précédente, ce qui peut s'expliquer en supposant que la sensibilité de l'animal contre ce procédé d'immunisation est émoussée. Pour obtenir une forte réaction il aurait probablement fallu, à ce point de l'immunisation, employer une bien plus grande quantité de poison (Ex. la variation après la dernière injection sur la courbe Fig. 2).

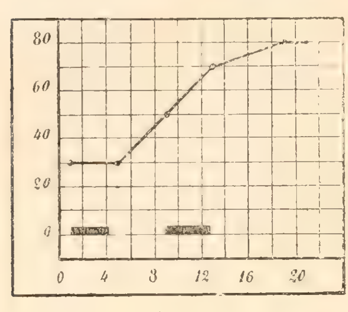


Fig. 5.

Nous appelons l'attention sur les particularités suivantes des courbes mentionnées :

1° Quoique on put s'attendre à une baisse très grande et éventuellement à une disparition complète de la force antitoxique *par l'injection coup sur coup de grandes doses* de poison, *la baisse a été nulle ou tout au plus insignifiante*, tandis qu'en même temps l'état général du cheval était très atteint (fièvre forte, manque d'appétit). Pour le moment nous ne pouvons que noter ce phénomène que nous avons aussi observé dans une quatrième expérience ;

2° Pendant la période des injections journalières avec de grandes doses de poison, et en présence de graves symptômes d'intoxication, *la force antitoxique* du sang *commence à s'élever rapidement*. Les phénomènes mentionnés sous 1° et 2° s'accordent d'ailleurs très bien avec les observations expérimentales et cliniques chez les individus morts d'une infection ou d'une intoxication, en même temps que leur sang contient beaucoup d'antitoxine (Behring, Metchnikoff et plusieurs autres) ;

3° Le *maximum* de la force antitoxique s'atteint relativement vite (en 4 à 8 jours) après la dernière injection ;

4° L'élévation de la force antitoxique fut relativement grande dans 2 des cas : depuis 30 jusqu'à 320 dans l'un des cas, et dans l'autre depuis 50 jusqu'à 180.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

13me ANNÉE AVRIL 1899 No 4

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

AGGLUTINATION ET DISSOLUTION DES GLOBULES ROUGES PAR LE SÉRUM

Par le Dr JULES BORDET

DEUXIÈME MÉMOIRE

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Nous nous proposons d'exposer dans le présent travail quelques faits complémentaires de ceux que nous avons récemment fait connaître[1]. Dans notre précédent Mémoire, nous avons énuméré les propriétés que possède le sérum de cobayes soumis à plusieurs injections de sang défibriné de lapin, et nous avons insisté sur les analogies étroites qui rapprochent un pareil sérum d'un sérum antimicrobien tel que le choléra-sérum.

Nous avons maintenant à nous demander en premier lieu si le pouvoir globulicide constitue le seul caractère des sérums antihématiques, et si ces liquides ne possèdent pas, en outre, certaines propriétés antitoxiques. Ensuite, nous chercherons à étendre la comparaison entre les sérums antihématiques et les sérums antimicrobiens. Nous rechercherons, par exemple, si un sérum antihématique, injecté à un animal neuf, confère aux humeurs de ce dernier un pouvoir globulicide ; on sait en effet que l'injection de choléra-sérum fait naître, dans le sérum de l'animal ainsi traité, un pouvoir vibrionicide intense.

1. Ces *Annales*, octobre 1898.

Mais la comparaison des divers sérums, relativement à leurs propriétés les plus importantes, doit se faire encore dans une autre direction. Il ne suffit pas de rapprocher les sérums antihématiques de ceux qui agissent sur les microbes. Il faut se demander en outre si les sérums neufs et les sérums spécifiques ont des caractères communs, s'il est possible de retrouver en germe, chez les animaux neufs, les propriétés actives qui se développeront et se spécialiseront à la suite des injections immunisantes. On sait que la faculté d'agglutiner et de détruire les globules rouges ou certains microbes existe déjà, à un certain degré, dans la plupart des sérums neufs. Les analogies qui se dessinent, à ce point de vue, doivent être précisées.

§ I. — Propriétés des sérums antihématiques.

Le sérum actif de cobaye, dont nous nous sommes occupé dans notre précédent travail, et que fournissent les cobayes injectés à plusieurs reprises de sang défibriné de lapin, exerce sur les globules de lapin une influence nocive : il les agglutine, il en provoque la dissolution. Il *attaque* donc les éléments figurés identiques à ceux qu'on a injectés aux animaux producteurs du sérum.

Mais on peut supposer qu'un pareil sérum possède aussi, à côté de ces « propriétés d'attaque », des « propriétés de défense ».

Supposons, pour préciser, que nous injections à un lapin neuf du sang de poule neuve. Le sérum de poule neuve est doué du pouvoir d'agglutiner et de dissoudre les globules de lapin. Il est désormais possible que le lapin « vacciné » contre ce sang de poule fournisse un sérum capable, non seulement d'attaquer avec énergie les hématies de poule, mais encore de défendre les globules de lapin contre l'action nocive que le sérum de poule peut exercer sur eux. En d'autres termes, à côté de la propriété antihématique comparable à la propriété antivibrionienne du choléra-sérum, nos sérums actifs pourraient être doués, dans une certaine mesure, de propriétés antitoxiques, la toxine étant représentée, dans l'exemple invoqué, par le sérum de poule. Nous avons donc à les étudier à deux points de vue, d'abord dans leur propriété antihématique, ensuite en ce qui concerne leur pouvoir antitoxique.

A. *Propriété antihématique.*

La propriété antihématique s'observe dans le sérum d'animaux qui ont été traités par des injections de sang défibriné provenant d'un animal appartenant à une espèce différente [1].

Le sérum des lapins qui ont reçu dans le péritoine quelques injections de 10 c. c. de sang défibriné de poule, présente des propriétés très analogues à celles que nous avons reconnues au sérum de cobayes traités par le sang de lapin. Tandis que le sérum de lapin neuf n'exerce sur les hématies de poule qu'une influence agglutinante et dissolvante très faible, le sérum actif agglutine et dissout ces éléments avec une grande énergie. Néanmoins il n'a d'action que sur le protoplasme de l'hématie et en respecte le noyau.

Lorsqu'on examine au microscope un mélange de sang de poule et de sérum actif, on trouve que les globules sont réduits à leurs noyaux, qui sont agglomérés en amas plus ou moins compacts : il ne reste du protoplasme qu'un stroma délicat. Si l'on colore par l'éosine, puis par le bleu de méthylène, on ne distingue aucun contour protoplasmique ; toute affinité du protoplasme pour l'éosine a disparu : par contre, les noyaux se colorent normalement en bleu. De telles lésions du globule ne caractérisent pas exclusivement l'action du sérum d'animaux traités : elles sont les mêmes lorsque les globules de poule sont mis en contact avec un sérum neuf doué d'une activité suffisante (tel est le sérum de chien). Seulement le sérum actif se distingue par l'intensité remarquable des propriétés qu'il peut, même à petite dose, manifester vis-à-vis des globules.

Le pouvoir dissolvant est détruit lorsque le sérum a été chauffé à 55° ; il est reconstitué, si à un tel sérum, qui a été chauffé, on ajoute du sérum neuf de lapin ou de cobaye ; ce sérum neuf contient, on le sait, de l'alexine [2]. Le sérum actif,

1. Des *lapins* qui ont reçu six injections intrapéritonéales de 10 c. c. de sang défibriné de *lapin* fournissent un sérum qui n'est doué d'aucune propriété particulière. Ceci est assez naturel. La production des matières actives qu'on trouve dans le sérum résulte évidemment d'une excitation cellulaire provoquée dans l'organisme traité, par l'introduction de substances étrangères que cet organisme ne possède pas normalement, qui sont capables de produire sur la cellule une certaine impression, en d'autres termes, qui peuvent amener un changement dans la constitution chimique ou physique de la cellule.

2. On peut remplacer le sérum neuf par de l'exsudat péritonéal extrait à un lapin neuf. Cet exsudat contient aussi, comme on sait, de l'alexine

chauffé à 55°, a gardé à la fois la propriété agglutinante et celle de constituer, avec l'alexine, un mélange doué d'un pouvoir globulicide intense. Nous n'insistons plus sur la signification de ces faits, ni sur les analogies — signalées dans notre article précédent — qui, sur ce point, unissent les sérums antimicrobiens aux sérums antihématiques.

Si l'on introduit, dans le péritoine d'un lapin neuf, du sang défibriné de poule, additionné de sérum actif exposé au préalable à la température de 55°, on constate la destruction rapide du protoplasme du globule, sous l'influence de l'alexine de l'exsudat péritonéal. Dans cet exsudat, on trouve les noyaux dépouillés de leur protoplasme, et qui résistent à l'action des humeurs, *in vivo*, comme ils lui résistaient *in vitro*. Ultérieurement, dans le péritoine, ces noyaux sont englobés par les macrophages.

On peut se demander si l'injection d'un sérum antihématique, provenant d'un animal traité, peut conférer, à un animal neuf de même espèce, une « immunité passive » analogue dans ses caractères à celle que procure l'injection de sérums antivibrioniens. On sait que le choléra-sérum donne lieu, lorsqu'on l'injecte à un animal neuf, à un phénomène remarquable : le sérum de l'animal injecté devient bactéricide pour le vibrion cholérique [1]. Il faut donc déterminer si le sérum extrait à un lapin injecté au préalable du sérum actif vis-à-vis des globules de poule, est nettement globulicide pour ces hématies.

On retire un peu de sang à un lapin neuf; on obtient ainsi le sérum A. Immédiatement après cette saignée, on lui injecte 10 c. c. du sérum actif, sous la peau du dos. Le lendemain, on pratique une nouvelle saignée ; on obtient ainsi le sérum B. On peut comparer la propriété globulicide du sérum A à celle du sérum B, et même mesurer assez exactement ces pouvoirs. On constate que le sérum B possède un pouvoir dissolvant bien accusé, tandis que le sérum A, qui est du sérum de lapin neuf, n'est doué que d'une très faible activité. Le sérum B présente en outre la propriété agglutinante, mais celle-ci n'y est représentée que faiblement ; elle s'est transmise, mais en s'atténuant beaucoup, ce qu'il faut attribuer à la dilution qu'elle a subie en

1. Ce fait important a été constaté pour la première fois par MM. Fränkel et Sobernheim. (*Hygienische Rundschau*, 1894, n° 1.)

se répandant dans les humeurs du lapin neuf. En effet, le sérum actif employé agglutine avec beaucoup d'énergie trois ou quatre parties de sang de lapin. Mais il ne produit plus, à aucune dose, d'agglutination rapidement constatable lorsqu'il a été dilué, au préalable, dans 20 ou 25 parties de solution de NaCl à 0,7 0/0 [1].

Nous avons signalé antérieurement le fait que les agglutinines, injectées sous la peau d'un animal neuf, passent dans le sang avec rapidité [2].

L'idée la plus naturelle qui découle de cette expérience est que les substances actives du sérum injecté sous la peau se diluent simplement dans les humeurs de l'animal neuf. Il s'ensuit que le sérum de cet animal doit acquérir, — d'une manière moins accusée bien entendu, — toutes les propriétés caractéristiques du sérum actif injecté. C'est en effet ce qui arrive. Chauffé à 55°, ce sérum B perd sa propriété dissolvante, mais il la récupère par l'addition d'un peu de sérum A (sérum neuf). Il est à peine nécessaire de dire que de telles expériences, comme toutes celles que nous relatons ici, comportent des témoins bien comparables et un dosage précis. On fait, par exemple, les mélanges suivants :

a) Mélange de : une partie de sang défibriné de poule ; quatre parties de sérum A chauffé au préalable (pendant une demi-heure), à la température de 55° ; trois parties de sérum A, non chauffé. — Ce premier mélange est le témoin.

b) Mélange de : une partie de sang défibriné de poule; quatre parties de sérum B, chauffé au préalable (pendant une demi-heure) à la température de 55° ; trois parties de sérum A, non chauffé.

Des gouttes de chaque mélange sont suspendues en lames creuses. On constate que les hématies restent intactes dans le mélange *a*). Le lendemain, on y trouve quelques noyaux libres, mais les hématies détruites ne sont qu'en faible minorité (le sérum de lapin neuf possède une activité globulicide très peu intense). Dans le mélange *b*), la destruction des hématies se fait très rapidement; au bout d'une heure, tous les noyaux sont libres.

Il faut avoir soin, dans ces expériences ayant trait au pouvoir

1. Dans de telles conditions, l'agglutination ne devient visible qu'au bout d'un temps assez prolongé. Il en est de même pour ce qui concerne le sérum B. Dans ces cas où l'agglutination est lente à se produire, il est nécessaire, pour la constater, d'opérer avec des sérums chauffés au préalable à 55° et dont le pouvoir dissolvant n'existe plus.

2. Mode d'action des sérums préventifs. Ces *Annales*, avril 1896. — Les agglutinines injectées sous la peau passent aussi dans l'exsudat péritonéal, mais en quantité plus faible que dans le sang (expérience faite au moyen de choléra-sérum).

dissolvant, d'exposer les divers liquides que l'on compare entre eux, à des températures entièrement identiques. La dissolution des hématies est en effet très accélérée par la chaleur (il en est de même, comme on sait, de la transformation granuleuse du vibrion cholérique).

On n'a aucune raison de supposer — l'expérience ci-dessus relatée le montre clairement — que l'injection de sérum actif aux animaux neufs aurait pour conséquence la sécrétion d'une alexine dissolvante spéciale, différente de celle qu'on trouve dans le sérum neuf. *Tout se passe comme si les substances injectées se diluaient simplement dans les humeurs de l'animal.* On peut faire, avec le sérum de l'animal injecté, les expériences réalisables avec le sérum actif lui-même.

En conséquence, si l'on admet que les substances propres du sérum actif ne font que se diluer dans les humeurs, sans subir aucune transformation quelconque, lorsqu'on les injecte aux animaux neufs, on doit admettre aussi que l'on peut, en mélangeant à du sérum A (sérum extrait au lapin neuf avant l'injection de sérum actif) une certaine quantité du sérum actif employé dans l'expérience, obtenir un liquide ayant exactement l'activité du sérum B (sérum extrait à l'animal après l'injection de sérum actif). On devra admettre, en outre, que pour obtenir une mixture possédant l'activité du sérum B, il faudra mêler le sérum actif au sérum A, en proportion comparable au rapport du volume de sérum actif injecté au volume des humeurs de l'organisme.

C'est en effet ce qui arrive. Dans l'expérience précédente, le sérum B (extrait à un lapin d'environ 2,000 grammes, et qui a reçu une injection de 10 c. c. de sérum actif) possède une activité très comparable à celle d'une dilution de une partie de sérum actif dans environ 20 parties de sérum A.

On peut faire cette expérience d'une manière plus précise, que voici. On injecte du sérum antihématique à un animal neuf. Par exemple, à un cobaye neuf, pesant 600 grammes, on injecte sous la peau 3 c. c. de sérum de cobaye actif vis-à-vis des globules de lapin. On a obtenu, au préalable, le sérum A en saignant l'animal avant l'injection; on obtient le sérum B en saignant le cobaye 24 heures après l'injection. On fait un mélange, nous l'appellerons sérum C, de une partie de sérum actif (identique à celui qu'on a injecté) et de 19 parties de sérum A. On chauffe ce mélange pendant une demi-heure à 55°, ainsi que le sérum B; on élimine ainsi l'alexine de ces deux liquides (ceux-ci pourraient différer quelque peu entre eux par

leur teneur en alexine, ce qui vicierait l'expérience). On compare alors les sérums B et C dans leur propriété de constituer, avec le sérum neuf A, qui contient de l'alexine, un mélange dissolvant pour les globules rouges de lapin On peut, en effet, mesurer l'activité de B et de C, en recherchant à quelle dose ils doivent agir sur des quantités déterminées de globules, pour que ceux-ci se dissolvent (dans le même temps à peu près) sous l'influence d'un volume donné de sérum neuf A. On trouve que B est légèrement moins actif que C. En conséquence, tout se passe comme si le sérum actif, injecté sous la peau d'un cobaye de 600 grammes, se diluait, en se répandant dans l'organisme, dans un volume d'humeurs légèrement supérieur à 60 c. c. Cette dilution est à peu près celle qui doit se produire dans la réalité.

Les divers faits que nous avons relevés jusqu'ici, l'identité de l'action exercée par les sérums sur les globules, *in vivo* d'une part, *in vitro* de l'autre, les expériences que nous venons de citer, nous permettent d'arriver à une conclusion entièrement identique à celle que nous avons émise antérieurement à propos des sérums antimicrobiens. Les sérums antihématiques ne possèdent pas de substance globulicide qui leur soit particulière; la substance globulicide (l'alexine), destructible à 55°, est répandue dans les sérums neufs comme dans les sérums d'animaux traités par le sang défibriné. Peu active dans le sérum neuf, elle agit énergiquement dans le sérum d'animaux traités, parce qu'elle se trouve alors mélangée à une substance spéciale, propre à ce sérum actif, résistant au chauffage à 55-60°, et qui favorise l'action de l'alexine. Le pouvoir globulicide intense, qui apparaît dans le sérum d'un animal neuf, à la suite de l'injection de sérum actif, est dû, non pas à une réaction de l'animal, ni à une transformation quelconque des substances injectées, mais simplement *à la rencontre, au sein de l'organisme, des deux substances nécessaires à la constitution d'un pouvoir globulicide intense:* l'organisme possédait déjà l'une de ces substances, l'alexine: l'autre, la substance spécifique, qui caractérise le sérum actif, lui est donnée par l'injection. Cette rencontre des deux substances, qui peut s'effectuer dans l'organisme, peut être réalisée aussi *in vitro* par le simple mélange de sérum neuf et de sérum actif intact ou préalablement chauffé à 55° ou 60°[1].

Spécificité du sérum de lapin actif vis-à-vis du sang de poule.

1. Nous nous bornons ici à reproduire exactement, en l'appliquant aux sérums antihématiques, la manière de voir que nous avons exprimée en 1895, pour les sérums antimicrobiens. (Ces *Annales*, juin 1895.)

— Nous n'avons pas fait un grand nombre d'expériences sur ce sujet, mais il paraît certain que ce sérum possède le caractère de la spécificité dans la même mesure, selon toute apparence, que les sérums antimicrobiens. Ce sérum de lapin n'a aucune action sur les globules de lapin, ce qui est assez naturel, mais il reste sans effet également sur les globules de cobaye : dans son action vis-à-vis de ces derniers, il n'est pas supérieur au sérum de lapin neuf : il ne s'en distingue guère non plus lorsqu'on le met en contact avec des hématies de pigeon, d'homme ou de souris. Pour aucun de ces globules, on ne constate l'agglutination et la dissolution énergiques, qui sont si frappantes lorsqu'on met en jeu les globules de poule.

Fixation par les globules des substances propres au sérum antihématique. — Les globules sensibles à l'influence d'un sérum antihématique déterminé fixent les substances actives de ce sérum. Nous avons déjà parlé de ce fait dans un travail récent[1] ; nous avons signalé aussi que les microbes absorbent de même *toutes les matières actives* des sérums antimicrobiens. Les globules. qui ne ressentent pas l'influence d'un sérum, n'en absorbent pas les substances actives. Ceci est vrai aussi pour ce qui concerne les sérums neufs. Par exemple, si l'on met en contact du sérum de poule neuve avec des globules de lapin, ceux-ci s'agglutinent énergiquement ; le liquide décanté est dépouillé de propriétés agglutinantes et n'agit plus sur de nouveaux globules de lapin. Mais si l'on met en contact du sérum de poule avec des globules que ce sérum n'agglutine que très faiblement (globules de cobaye) le liquide décanté conserve tout son pouvoir vis-à-vis de globules bien agglutinables.

Voici, pour ce qui concerne l'absorption des principes actifs d'un sérum antihématique, la technique de l'expérience :

On se sert de sérum actif chauffé préalablement à 55° pendant une demi-heure, et qui, par conséquent, n'est plus dissolvant. On met dans des tubes les mélanges suivants :

A) Mélange de 3 c. c. de *sérum* de lapin neuf et de 1/2 c. c. de sérum actif de cobaye.

B) Mélange de 3 c. c. de *sang défibriné* de lapin neuf et de 1/2 c. c. de sérum actif de cobaye.

1. Ces *Annales*, mars 1899. Le mécanisme de l'agglutination.

Le premier tube sert de témoin. Les deux tubes contiennent des quantités de sérum actif égales et semblablement diluées. Seulement le second tube contient des globules, tandis que le premier n'en contient pas. On centrifuge, on décante. Les liquides clairs obtenus sont éprouvés d'abord au point de vue de leur pouvoir agglutinant. On constate que le premier liquide (A), qui n'a pas été au contact de globules, agglutine très énergiquement les globules de lapin ; l'autre (B) n'agglutine pas. On recherche ensuite si ces deux liquides sont également susceptibles de constituer, avec l'alexine d'un sérum neuf, des mélanges dissolvants pour les globules. On prépare les mélanges :

a) Mélange de une partie de sang défibriné de lapin neuf, une partie du liquide A, cinq parties de sérum frais de cobaye neuf;

b) Mélange de une partie de sang défibriné de lapin neuf, une partie de liquide B, cinq parties de sérum frais de cobaye neuf.

On constate que la dissolution se fait très rapidement dans le mélange *a*) et que les globules restent intacts dans le mélange *b*).

On voit que les globules rouges fixent avidement les substances actives des sérums antihématiques. Aussi l'impression produite sur eux par ces substances (et qui amènent leur agglutination et la sensibilisation à l'alexine) est profonde et ne s'efface pas si on soumet ces globules à des lavages répétés, si on tente d'éliminer ainsi les substances actives qu'ils ont absorbées. Ces lavages s'opèrent très facilement. On verse dans un tube à essais quelques gouttes d'eau physiologique chargée de nombreux globules [1] ; on ajoute une petite quantité de sérum actif qu'on a, au préalable, chauffé à 55°, pour éliminer l'action dissolvante. On remplit le tube d'eau physiologique. On agite, puis l'on centrifuge ; on décante le liquide clair en ne laissant que le dépôt de globules ; on ajoute de nouveau de l'eau physiologique, et l'on répète les mêmes opérations ; on obtient finalement un dépôt de globules bien lavés.

Ceux-ci, mis en contact avec du sérum neuf, se dissolvent aussi rapidement que des globules traités par la même dose de sérum actif, mais qui n'ont été soumis à aucun lavage.

De tels faits semblent prouver nettement que cette substance particulière, résistante à la chaleur, propre au sérum des vaccinés, et qui permet l'action énergique de l'alexine dissolvante, *porte son action sur les globules eux-mêmes*, pour les impressionner directement et *les sensibiliser* à l'action de l'alexine. On aurait pu

1. Dans cette expérience, les globules ont été eux-mêmes lavés au préalable ; ce lavage avait pour but d'enlever le sérum qui accompagne les globules dans le sang défibriné ; il était utile, dans cette expérience, de ne faire intervenir aucune trace d'alexine.

supposer aussi que cette substance spéciale agit, non pas sur les globules, mais directement sur l'alexine pour la rendre plus énergique. Cette dernière hypothèse n'est pas d'accord avec les faits; en outre, elle expliquerait d'une manière moins satisfaisante l'existence de la spécificité. Il paraît démontré, par l'expérience ci-dessus, que si l'on fait un mélange de globules, de sérum actif qui a été chauffé à 55°, et de sérum neuf, il ne se passe aucune réaction dans la partie liquide du mélange, entre l'alexine et la substance spéciale du sérum actif; cette dernière en effet se sépare rapidement du liquide pour se fixer avec énergie sur les éléments figurés; ceux-ci deviennent alors sensibles à l'action de l'alexine, qu'on peut d'ailleurs n'ajouter qu'ultérieurement, alors que toute la dose de substance sensibilisatrice présente s'est combinée aux globules. — Des expériences semblables peuvent être faites avec les microbes (vibrions cholériques) et les sérums antimicrobiens [1]. Nous admettrons donc, comme suffisamment démontrée, l'idée déjà acceptée auparavant par nous, *que les sérums spécifiques contiennent une substance sensibilisatrice, rendant le globule ou le microbe susceptibles d'être attaqués par l'alexine.*

Nous n'avons jusqu'ici relevé que des analogies très étroites entre les propriétés manifestées par un sérum de cobaye actif vis-à-vis du sang de lapin, et celles que présente le sérum de lapin actif vis-à-vis du sang de poule. Il existe cependant entre ces sérums une différence qui mérite d'être signalée.

Comme nous l'avons dit dans notre notice précédente, si l'on fait agir, sur du sang défibriné de lapin, du sérum actif de cobaye chauffé à 55°, on constate que les globules sont partiellement atteints et que le liquide prend une teinte rouge bien visible. Cela tient, ainsi que nous l'avons fait remarquer, à ce que les globules sont légèrement attaqués par la petite dose d'alexine (de lapin), qui se trouve, à côté des globules, dans le sang défibriné. En effet, si l'on traite par le sérum actif chauffé à 55°, non plus du sang défibriné ordinaire, mais des globules préalablement lavés à l'eau physiologique (et centrifugés ensuite), on constate qu'il ne se produit aucune dissolution : l'alexine a été

1. Des vibrions cholériques, impressionnés par le choléra-sérum, puis lavés soigneusement, se transforment en granules sous l'action de sérum neuf, ou lorsqu'on les introduit dans le péritoine d'un cobaye neuf.

éliminée par le lavage. D'autre part, si à ces globules de lapin, lavés et impressionnés, on ajoute une dose suffisante de sérum de lapin neuf, la dissolution se fait avec rapidité et complètement. Donc, des globules de lapin, sous l'influence de la substance sensibilisatrice, deviennent accessibles à l'action de l'alexine du lapin lui-même. On s'attend, par analogie, à ce que les globules de poule, additionnés de sérum actif chauffé au préalable à 55° (sérum provenant d'un lapin injecté de sang de poule), se dissolvent aussi dans le sérum neuf de poule. Or cette dissolution ne se produit pas. Malgré l'influence de la substance sensibilisatrice, les globules de poule ne sont donc pas devenus sensibles à l'alexine de la poule elle-même.

Ce fait montre assez clairement que les alexines, provenant d'animaux d'espèces différentes, ne sont pas complètement identiques. Leurs caractères les plus importants leur sont communs; elles agissent toutes à peu près de la même façon sur un même microbe, mais elles se montrent différentes par rapport à leur action sur les hématies. Cette notion s'imposait d'ailleurs, *à priori*, car l'étude de l'action des sérums neufs sur les globules montre que les hématies d'un animal ne sont point attaquées par l'alexine provenant du même animal, tandis qu'elles sont sensibles à l'action altérante d'alexines élaborées par des organismes différents.

On pourrait rapprocher, si une comparaison un peu grossière était permise, la modification apportée par la substance sensibilisatrice sur le gobule, de celle qui consisterait à changer la structure d'une serrure, de façon à y permettre l'introduction facile d'une ou de plusieurs clefs qui n'y entraient pas auparavant ou n'y pénétraient qu'avec difficulté. Deux clefs suffisamment semblables entreront dès lors indifféremment. De même, les alexines de cobaye ou de lapin « entrent » l'une et l'autre, dans le globule de lapin et dans le globule de poule, lorsque ces globules sont préalablement sensibilisés. Au contraire, l'alexine de poule, étant vraisemblablement trop différente des alexines de cobaye ou de lapin, « n'entre » pas dans le globule de poule préalablement sensibilisé par le sérum actif. Peut-être « l'entrée » (ou si l'on veut, la mise en jeu efficace) de l'alexine dépend-elle non seulement de la nature de l'alexine, mais aussi de la nature, *de la provenance spéciale* de la substance sensibilisa-

trice. Il y a là une série d'essais à faire, et faute de documents suffisants, nous nous bornons actuellement à signaler dans quel sens le mode d'action de ces diverses matières pourrait être utilement approfondi.

Action de la chaleur sur les substances actives du sérum. — Si l'on chauffe à 55° du sérum de lapin actif vis-à-vis des globules de poule, les propriétés agglutinante et sensibilisatrice persistent, ainsi qu'on l'a vu, tandis que la fonction dissolvante est supprimée.

Après un chauffage d'une demi-heure à 60°,5, les pouvoirs agglutinant et sensibilisateur sont intacts; le chauffage à 65° fait baisser légèrement le pouvoir agglutinant, lequel devient très faible après un chauffage pendant le même temps à 70°; ce pouvoir est alors presque imperceptible. Nous devons faire ici la remarque que le même sérum, non chauffé, n'agglutine visiblement à aucune dose, lorsqu'il a été préalablement dilué dans environ 20 parties d'eau physiologique; ceci nous montre que pour agir sur les globules, l'agglutinine doit se trouver à un certain état de concentration; on ne doit pas conclure, de l'absence du phénomène, à l'absence complète de la substance active. La propriété sensibilisatrice se manifeste encore fortement dans le sérum chauffé à 70° (de même que dans le sérum dilué de 20 parties d'eau). C'est ainsi que une partie de sang défibriné mêlée à une grande dose, par exemple à 2 parties du sérum chauffé à 70°, et à 4 parties de sérum de lapin neuf, présente rapidement le phénomène de la dissolution. Mais si l'on fait agir sur des quantités égales de sang défibriné, additionné de sérum neuf, des doses *relativement faibles*, d'une part de sérum actif chauffé à 60°, d'autre part du même sérum chauffé à 70°, on trouve que la dissolution se fait plus lentement dans le dernier mélange; la propriété sensibilisatrice du sérum a été diminuée par le fait du chauffage à 70°. Elle est très atténuée, sans avoir complètement disparu, après un chauffage de 1/2 heure à la température de 75°.

Faisons observer que si l'on mélange du sang défibriné de poule avec du sérum neuf et du sérum actif chauffé à 70°, on peut obtenir la dissolution sans observer d'agglutination préalable: les globules se montrent bientôt réduits à des noyaux

isolés. L'agglutinine est sinon détruite, au moins devenue trop faible ou trop peu abondante ; elle ne peut plus exercer effectivement son influence et provoquer la formation d'amas; néanmoins, la sensibilisation a pu encore s'opérer.

Propriété précipitante. — A côté de la propriété antihématique du sérum, nous devons signaler la propriété que présente le sérum de lapin actif vis-à-vis des globules de poule, de faire naître un précipité dans le sérum neuf de ce dernier animal. Nous avons déjà abordé cette question dans un mémoire précédent [1], et nous avons rappelé à ce propos les recherches de M. Tchistovitch, à qui l'on doit les premières constatations d'un pareil phénomène. Quand on mélange les deux sérums, il se fait rapidement un trouble d'abord léger, qui augmente bientôt et finit par se condenser en flocons. C'est dans un mélange de une ou deux parties de sérum de poule avec huit ou neuf parties de sérum actif, que le précipité est le plus abondant.

Si, au lieu de traiter des lapins par du sang de poule, on fait l'inverse, c'est-à-dire si l'on traite des poules par du sang de lapin, on constate que le sérum de ces poules précipite le sérum neuf de lapin. Le phénomène de précipitation ne se retrouve néanmoins pas régulièrement dans tous les cas soumis à l'examen ; le sérum de cobayes traités par le sang de lapin ne précipite pas le sérum de ce dernier animal. Les sérums d'animaux neufs différents ne donnent jamais de précipité lorsqu'on les mélange.

B. — *Propriété antitoxique.*

Il était vraisemblable qu'on pût arriver à produire des sérums doués de pouvoir antitoxique, capables de s'opposer à l'action destructive exercée sur les globules rouges par certains sérums. En effet, MM. Camus et Gley, Kossel ont montré que des animaux immunisés contre le sérum d'anguille élaborent des substances capables de protéger leurs globules contre l'action dissolvante de ce sérum toxique.

1. Mécanisme de l'agglutination. Ces *Annales*, mars 1899. Nous ne reviendrons pas ici sur la signification qui nous paraît devoir être attribuée à ce phénomène. Nous avons déjà mentionné l'action de la chaleur sur ces propriétés de précipitation, et recherché jusqu'à quel point ces propriétés sont spécifiques. Rappelons que le sérum dont il s'agit précipite aussi le sérum neuf de pigeon.

Pour que les expériences puissent conduire à des résultats aisément constatables, il faut évidemment que la « toxine » employée soit puissante. Il faut donc injecter à des animaux d'espèce A, du sérum (ou du sang défibriné) qui provient d'une espèce animale B, et qui est capable d'agglutiner et de dissoudre, avec beaucoup d'énergie, les globules rouges de l'animal appartenant à l'espèce A. Les lapins et le sang de poule satisfont aux conditions exigées : l'action agglutinante et dissolvante du sérum de poule neuve sur les hématies de lapin est en effet fort énergique. Au contraire, la propriété antihématique du sérum de lapin neuf vis-à-vis des globules de cobaye n'existe qu'à un degré relativement faible ; le sérum de cobaye « vacciné » contre du sang de lapin ne convient guère, en conséquence, à l'étude de la propriété antitoxique (antihématoxique).

Le sérum de poule neuve agglutine avec beaucoup d'énergie partie égale de sang défibriné de lapin. En outre, trois ou quatre parties de ce sérum, ajoutées à une partie de ce sang, dissolvent rapidement les globules. Des lapins, qui ont reçu dans le péritoine trois injections de 10 c. c. de sang de poule, présentent une fonction antitoxique du sérum, qui, à la vérité, n'est pas extrêmement intense. On peut la mettre en évidence en faisant des mélanges, d'une part, de sang de lapin neuf, de sérum de poule (frais), et de sérum actif de lapin ; — d'autre part, de sang de lapin neuf, de sérum de poule (frais) et de sérum de lapin neuf. Ce second mélange sert de témoin. Voici, par exemple, la constitution exacte de pareils mélanges :

a) Une partie sang de lapin neuf ; trois parties sérum de poule ; dix parties sérum actif de lapin ;

b) Une partie sang de lapin neuf ; trois parties de sérum de poule ; dix parties de sérum neuf de lapin.

Dans le mélange *b*, les globules forment très rapidement de *très gros amas compacts*, lesquels, au bout de 2 à 3 heures, se dissolvent. Dans le mélange *a*, les globules restent indéfiniment intacts, et l'agglutination qu'on y observe est très faible ; les amas sont fins et petits.

Outre le pouvoir de s'opposer à la dissolution des globules, *nous reconnaissons au sérum actif un réel pouvoir anti-agglutinant.*

Le mélange témoin montre que le sérum de lapin neuf ne possède point de propriétés antitoxiques.

Si l'on cherche à diminuer beaucoup la dose de sérum actif, ou à augmenter la dose de sérum dissolvant de poule, l'effet antitoxique n'est plus observable. Ainsi, dans un mélange constitué de une partie de sang de lapin, trois parties de sérum actif, six parties de sérum de poule, les globules se dissolvent sans retard appréciable.

Pour constater nettement, non pas l'action « antidissolvante », mais l'influence de l' « antiagglutinine », il convient d'employer du sérum de poule qui a été chauffé à 55°, et qui, on le sait, n'est plus dissolvant, mais agglutine avec une énergie très grande volume égal de sang de lapin. On prépare par exemple les mélanges :

a) Sang défibriné, une partie; sérum actif, dix parties; on ajoute une partie de sérum de poule;

b) Sang défibriné, une partie; sérum neuf (de lapin), dix parties; on ajoute une partie de sérum de poule.

L'agglutination est très rapide et extrêmement forte dans le mélange *b*), elle reste nulle ou extrêmement faible dans le mélange *a*).

Chaque fois qu'on mélange du sérum actif à du sérum de poule, il se forme un précipité. On pourrait supposer que le sérum actif ne contient pas, à proprement parler, une substance antitoxique et admettre que le précipité entraîne, au moment de sa formation, les matières nocives du sérum de poule et rend ainsi ce sérum inactif. Cette objection n'est pas fondée; en effet, le sérum actif de lapin, chauffé à 70°, a perdu la propriété de faire naître un précipité dans le sérum de poule, mais il manifeste encore ses propriétés antiagglutinantes. En outre, il a gardé le pouvoir de s'opposer à la dissolution des globules par l'alexine de poule.

Ceci nous montre que la substance, qui s'oppose à la dissolution par l'alexine, est une substance *toute différente des alexines elles-mêmes*.

Le sérum de cobayes « vaccinés » contre le sang de lapin manifeste aussi des propriétés antitoxiques, mais ces propriétés sont très faibles.

§ II. Analogies entre les sérums spécifiques et les sérums normaux. Analogies entre les substances actives sur les microbes et celles qui agissent sur les globules.

On sait que différentes propriétés des sérums spécifiques se retrouvent aussi, à un degré faible, il est vrai, dans les sérums normaux. Ceux-ci peuvent manifester en effet des actions agglutinantes, des actions dissolvantes, soit sur les microbes, soit sur les globules. Comme on ne peut se défendre de l'idée bien naturelle que les propriétés acquises par les organismes, à la suite de l'immunisation, ne sont que le perfectionnement, l'exaltation de facultés préexistantes, il n'est pas sans intérêt de rechercher si les substances actives qui existent, d'une part dans les sérums de vaccinés, d'autre part dans les sérums neufs, possèdent des caractères communs et doivent être considérées comme étant proches parentes. Il est utile de comparer, par exemple, les propriétés antihématiques, si fortement accusées dans le sérum des animaux traités par le sang défibriné, avec celles qu'on trouve dans les sérums neufs et qui sont de même ordre.

La propriété d'agglutiner et de dissoudre les hématies est très communément répandue parmi les sérums neufs.

On le sait, ceux-ci n'agissent que sur des globules provenant d'animaux différents de ceux qui fournissent le sérum considéré. Voici quelques renseignements sur l'activité agglutinante de quelques sérums neufs vis-à-vis de variétés diverses de globules rouges (on mélange, en général, une partie de sang défibriné à trois ou quatre parties de sérum).

Le sérum de cobaye agglutine assez faiblement divers globules, tels que ceux de lapin, de poule, un peu plus fortement ceux de rat.

Le sérum de lapin n'a également que des propriétés agglutinantes faibles (par exemple sur les globules de cobaye, d'homme, de poule, de rat).

Le sérum de poule manifeste un pouvoir agglutinant très énergique vis-à-vis des globules de chien, de rat et surtout de lapin; au contraire, son action agglutinante sur les globules de cobaye est très faible. Il agglutine assez fortement les globules de pigeon.

Le sérum de pigeon ne manifeste que des propriétés aggluti-

nantes extrêmement faibles (globules de poule, lapin, homme). Son action agglutinante sur les microbes est aussi très peu intense.

Le sérum de chien agglutine assez fortement les globules de lapin, de rat, faiblement ceux de cobaye, de poule.

Le sérum de rat agglutine faiblement les globules de lapin, de cobaye.

Le sérum de chèvre agglutine nettement les globules de lapin, de cobaye.

Le sérum de cheval agglutine nettement les globules de cobaye, de lapin, de poule, et très énergiquement les globules de rat.

Quant au pouvoir dissolvant des sérums sur les globules, il est toujours exercé par l'alexine, cette substance destructible à 55°. C'est une règle générale, et qui s'applique aux divers sérums, que le pouvoir de détruire les globules rouges disparaît par le chauffage à 55° [1].

L'action destructive la plus puissante que nous ayons constatée en étudiant les sérums neufs, est celle qu'exerce le sérum de poule sur les globules de lapin. Une partie de sang défibriné de lapin se dissout rapidement dans deux ou trois parties de sérum de poule. L'action destructive de ce sérum vis-à-vis des globules de rat est très nette également ; elle est très faible vis-à-vis des globules de cobaye.

Le sérum de chien dissout très énergiquement aussi les globules de poule (il respecte, bien entendu, le noyau) ; il atteint aussi très bien les globules de lapin, de cobaye.

Le sérum de cobaye, de lapin, exercent sur les globules de poule, d'homme, une action destructive faible. Le sérum de cobaye n'agit sur les globules de lapin que lentement et à forte dose. Le sérum de lapin est plus actif vis-à-vis des globules de cobaye ; il est à peu près complètement dénué d'action vis-à-vis des globules de rat.

Il faut remarquer, à propos de l'ensemble de ces constatations, que la puissance agglutinante ou dissolvante de divers échantil-

1. Il existe cependant une exception, mais elle n'est qu'apparente. Les globules de chien se dissolvent encore dans des sérums qui ont été chauffés à 55°. Mais ces globules se dissolvent aussi dans le sérum provenant du même animal. Il s'agit là, non point d'une action alexique, mais d'une fragilité toute spéciale et exceptionnelle, qui caractérise les globules rouges de chien.

lons d'un même sérum neuf n'est pas toujours la même; il y a des différences individuelles qui peuvent être assez marquées.

L'examen des résultats ci-dessus consignés ne permet guère de poser des règles quelque peu générales. On n'est guère autorisé, par exemple, à classer nettement les globules en groupes, suivant leur sensibilité aux actions agglutinantes ou dissolvantes.

Des globules d'une certaine espèce seront très facilement agglutinés par un sérum neuf, et résisteront à l'action d'un autre sérum. De même, on ne peut pas admettre d'une manière absolue, que si un sérum donné agglutine très énergiquement une certaine espèce de globules, il se montrera très actif également vis-à-vis des autres variétés d'hématies. Par exemple, le sérum de poule, qui influence si vivement les globules de lapin, de chien, de rat, n'impressionne presque pas les globules de cobaye. On ne peut davantage émettre, comme règle générale, qu'un sérum capable de dissoudre très activement des globules d'une certaine espèce, les agglutine nécessairement avec une grande énergie. S'il est vrai, par exemple, que le sérum de poule dissout très aisément les globules de lapin, et les agglutine fortement, on trouve, d'autre part, que le sérum de chien n'agglutine les globules de poule que très faiblement, alors qu'il les détruit avec beaucoup d'activité. Il faut admettre que, dans ces réactions des sérums sur les globules, deux facteurs tout à fait distincts entrent en jeu. C'est, d'une part, la richesse plus ou moins grande du sérum en substances actives. C'est, d'autre part, la sensibilité *spéciale* du globule considéré vis-à-vis des matières propres au sérum employé dans l'expérience, les globules pouvant être très sensibles à l'influence des substances actives de ce sérum, tout en étant beaucoup plus réfractaires à l'action de celles qui existent dans un sérum neuf différent. Malgré les ressemblances qu'elles présentent dans leur mode d'action, les agglutinines, provenant de sérums neufs différents, ne sont pas identiques : il doit exister entre elles des différences de constitution chimique, probablement assez faibles, expliquant la diversité de leur action vis-à-vis d'une même race de globules. La même observation s'applique aussi aux alexines fournies par des animaux d'espèce différente. Corrélativement, les globules de différentes espèces sont différents de constitution ; ils ont tous leur

façon spéciale de réagir vis-à-vis d'une même alexine ou d'une même agglutinine.

En outre, nous avons décrit, dans notre mémoire sur le mécanisme de l'agglutination, une expérience tendant à faire admettre qu'un même sérum neuf contient plusieurs agglutinines différentes.

* * *

Il convient de rechercher jusqu'à quel point les substances douées de propriétés comparables se ressemblent dans les divers sérums où elles se rencontrent. Il faut donc comparer, par exemple, les agglutinines des sérums neufs à celles des sérums de vaccinés, les agglutinines et substances sensibilisatrices antihématiques à leurs correspondantes antimicrobiennes.

Nous avons déjà longuement insisté sur ce fait que, pour ce qui concerne les alexines, les sérums neufs ne se distinguent pas des sérums de vaccinés, qu'il s'agisse de sérums antimicrobiens ou de sérums antihématiques.

D'autre part, les alexines qui agissent sur les globules paraissent entièrement identiques à celles qui agissent sur les microbes. De même que le pouvoir d'altérer les globules rouges, le pouvoir de transformer les vibrions en granules est très répandu dans les sérums de provenances les plus diverses. Les vibrions, surtout s'ils sont sensibilisés par une trace de choléra-sérum, se transforment facilement en granules lorsqu'on les met en contact avec les sérums neufs de lapin, de cobaye, de chèvre, de poule, de chien, de rat, de pigeon ; il n'existe entre ces sérums que des différences peu importantes dans l'intensité de leur action [1]. Ces sérums perdent tous leur activité lorsqu'ils sont portés à une température d'environ 55° ; ils sont en même temps dépouillés de leur activité destructive vis-à-vis des glo-

1. Il s'agit ici bien entendu, des actions bactéricides qui dépendent des alexines, et que ne produisent plus les sérums chauffés à 55°. L'exemple typique de ce genre d'actions est la métamorphose des vibrions en granules arrondis. Mais on peut trouver, dans certains sérums, des substances bactéricides nettement distinctes des alexines. Le sérum de rat, chauffé à 55°, est devenu absolument incapable de transformer en granules des vibrions cholériques sensibilisés par le choléra-sérum, tandis que le sérum de rat, intact, possède cette propriété commune d'ailleurs aux divers sérums neufs. Mais ce sérum de rat, chauffé, détruit de la façon la plus évidente, sans que son activité ait été diminuée, la bactéridie charbonneuse. M. Sawtchenko a constaté antérieurement la résistance à une température de 55°-60° du pouvoir bactéricide spécial que le sérum de rat manifeste contre la bactérie charbonneuse.

bules. Les différences entre alexines de diverses provenances (différences qui se trahissent lorsque ces alexines agissent sur des globules) n'entrent guère en ligne de compte lorsque ces alexines agissent sur les vibrions.

Tandis que le fait de posséder des alexines ne caractérise pas exclusivement les sérums des vaccinés, puisque ces alexines se rencontrent avec les mêmes caractères dans les sérums neufs, les propriétés agglutinantes des vaccinés se distinguent nettement de celles qu'on trouve dans les sérums neufs ; elles sont en effet très intenses et douées du caractère de la spécificité. On peut néanmoins rechercher si, malgré ces différences, les agglutinines des vaccinés se comportent, sous l'action de la chaleur, de la même manière que les agglutinines des sérums neufs.

On peut commencer par établir dans quelle mesure l'action de la chaleur affaiblit les propriétés agglutinantes qu'un même sérum neuf manifeste, d'une part à l'égard de globules, d'autre part vis-à-vis de microbes. On choisit pour ce genre d'expériences certains bacilles très agglutinables, aptes à se réunir en amas sous l'influence de sérums neufs les plus divers. Nous opérions spécialement sur un échantillon de bacille de la fièvre typhoïde. Sans entrer dans le détail fastidieux de ces expériences, nous dirons, pour en exprimer le résultat général, que l'action d'une température suffisamment élevée fait perdre, en même temps, à un sérum neuf donné, d'une manière entièrement corrélative, la propriété d'agglutiner les microbes et celle d'agglutiner les globules. Pour les divers sérums, les propriétés agglutinantes ne sont pas atteintes par un chauffage à 55° pendant une demi-heure. Pour ce qui concerne les sérums de cobaye, chèvre, chien, cheval, poule, ces propriétés sont très nettement diminuées, mais non abolies à la suite d'un chauffage à 61°-62 pendant le même temps. Quand les expériences portent sur des sérums n'agglutinant que médiocrement, l'action agglomérante n'est presque plus constatable après un pareil chauffage ; elle est au contraire encore très visible, s'il s'agit d'agglutinations très fortes à l'origine. C'est ainsi qu'on peut encore distinguer l'agglutination des globules de lapin par le sérum de poule, même après un chauffage de ce dernier à 67°. Le pouvoir agglutinant devient de plus en plus faible, au fur et à mesure qu'on

met en jeu des sérums chauffés à des températures plus élevées; il n'est plus constatable chez les sérums neufs chauffés pendant une demi-heure à 70°.

Le sérum dans lequel les agglutinines résistent le mieux est, parmi les sérums que nous avons étudiés à ce point de vue, celui de lapin. Il faut pour observer dans ce sérum une diminution nette du pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules ou des microbes, le chauffer à 65° environ.

On rencontre des analogies très nettes encore lorsqu'on compare l'action de la chaleur, d'une part sur les agglutinines des sérums normaux, d'autre part sur celles (spécifiques) qui sont propres aux sérums des vaccinés. Il faut seulement tenir compte, dans ces essais, de ce que les agglutinations spécifiques sont beaucoup plus énergiques; en conséquence, une diminution apportée à leur activité ne se décèle pas avec autant d'évidence qu'un affaiblissement dans l'énergie, déjà faible à l'origine, des agglutinines de sérums neufs. On constate, par des expériences portant sur des sérums de chèvre, de lapin, de cobayes, vaccinés contre le vibrion cholérique, de chien vacciné contre le bacille de la fièvre typhoïde, que le pouvoir agglutinant spécifique est diminué lorsque le sérum a été exposé aux températures qui affaiblissent le pouvoir agglutinant normal: pour le cobaye, la chèvre, la diminution apparaît déjà après le chauffage à 61°-62°; ces sérums chauffés à 70° deviennent presque inactifs. Le sérum de lapin vacciné possède des agglutinines spécifiques nettement plus résistantes; nous avons vu plus haut qu'il en est de même pour les agglutinines normales du sérum de lapin neuf. Deux choléra-sérums, l'un provenant d'un cobaye, l'autre fourni par un lapin, ne se comportent donc pas tout à fait de même relativement à l'action de la chaleur; après un chauffage à 70°, la diminution d'activité n'est que partielle et même légère dans le second: elle est considérable dans le premier. Il faut observer que le sérum de lapin résiste mieux que celui du cobaye à l'action coagulante de la chaleur. Le sérum de cobaye mélangé à partie égale de solution de Na Cl à 0,7 0/0 ne se coagule pas après un chauffage à 65° (prolongé pendant une demi-heure), mais il devient opalescent; dans ces conditions, le sérum de lapin ne change pas d'aspect; il devient légèrement opalescent lorsqu'on l'a chauffé à 70°. Il est superflu

d'insister sur ce fait qu'il y a vraisemblablement des rapports étroits entre l'apparition d'une coagulation ou d'une opalescence et la diminution d'énergie des substances actives.

On peut dire, en résumé, que les diverses agglutinines agissant sur les globules ou les microbes *se comportent à peu près de même sous l'influence de la chaleur, qu'il s'agisse de sérums neufs ou de sérums spécifiques.* Elles diminuent progressivement d'activité, lorsqu'on les soumet à l'élévation de la température, sans qu'on puisse préciser une température critique au-dessous de laquelle elles restent intactes, au-dessus de laquelle elles se détruisent. Dans le sérum de certains animaux, les agglutinines se montrent plus résistantes qu'elles ne le sont dans le sérum d'autres espèces.

Puisque la chaleur affaiblit la propriété dont les sérums sont doués, d'agglutiner les globules et les microbes, on pouvait se demander si elle diminue dans le même rapport la propriété que possèdent les sérums spécifiques de sensibiliser les éléments figurés à l'action de l'alexine. La recherche a son intérêt, car elle peut contribuer à résoudre la question de savoir si le phénomène de la sensibilisation et celui de l'agglutination sont dus à une même substance ou à des substances différentes. Nous n'aborderons pas ici ce sujet, nous réservant d'examiner plus tard, dans leur signification, les faits qui se rattachent à cette question [1].

Bournons-nous à constater ici que *l'exposition des sérums spécifiques à des températures de 65 à 70°, qui affaiblisssent très visiblement le pouvoir agglutinant et immobilisant, diminue nettement le pouvoir sensibilisateur.* Le choléra-sérum de lapin, chauffé à 70°, et dont le pouvoir agglutinant vis-à-vis du vibrion est devenu un peu moins énergique, est aussi légèrement affaibli dans son pouvoir sensibilisateur. Il faut, pour constater une semblable diminution, mettre des vibrions en contact *avec des doses faibles* et identiques, d'une part de sérum chauffé à 55°, d'autre part de sérum chauffé à 70°. Les deux émulsions ainsi obtenues sont inégalement agglutinées. Si on met, *in vitro*, ces

1. L'agglutination est un phénomène complexe. Par exemple, lorsqu'il s'agit de microbes mobiles, l'agglutination comporte et nécessite l'immobilisation de ces microbes. On n'a point démontré jusqu'ici que ces deux phénomènes sont dus à l'activité de la même substance. Le fait que l'agglutination résulte de la coopération de facteurs divers paraît très probable, si l'on se reporte aux expériences que nous avons relatées antérieurement et qui ont trait au rôle de NaCl dans l'agglutination.

deux émulsions en contact avec du sérum neuf, on constate que la transformation en granules est beaucoup moins étendue pour l'émulsion additionnée de sérum chauffé à 70° que pour celle contenant le sérum chauffé à 55°. De même, ces deux émulsions mises en contact *in vivo*, par injection dans le péritoine, avec l'exsudat péritonéal, se transforment très inégalement. Les cobayes qui reçoivent l'émulsion additionnée de sérum chauffé à 55° présentent dans leur exsudat la transformation granuleuse du vibrion, ils résistent ; chez les autres, des vibrions mobiles persistent et l'infection mortelle se produit. — Si l'on emploie des doses de sérum notablement supérieures à la dose minimale active, la différence entre les deux émulsions ne se décèle plus nettement : — en effet, nous le répétons, l'affaiblissement des propriétés du sérum, sous l'influence du chauffage, n'a été que partiel. — Une semblable diminution s'observe, ainsi qu'il a été dit plus haut, pour ce qui concerne le sérum actif de lapin traité par le sang de poule, lorsqu'on porte ce sérum à la température de 70°.

La propriété sensibilisatrice du choléra-sérum de cobaye est, comme le pouvoir immobilisant et agglutinant, affaiblie sous l'action de températures inférieures à 70° ; après un chauffage à 65°, l'affaiblissement est déjà très notable.

La propriété sensibilisatrice existe-t-elle dans les sérums neufs ? Dans ces sérums, l'action de l'alexine n'est-elle pas favorisée par celle d'autres matières ? Il est difficile d'en juger, car on n'a pu jusqu'ici isoler l'alexine des autres matières existant dans le sérum. Cependant, en combinant l'action des deux sérums neufs, on peut constater parfois l'existence d'une propriété sensibilisatrice. C'est ainsi que des vibrions cholériques, immobilisés et agglutinés par du sérum de cheval neuf, se transforment aisément en granules lorsqu'on ajoute au mélange du sérum neuf (de cobaye). Il faudrait cependant se garder de généraliser la portée de cette observation ; on ne pourrait conclure qu'il suffit d'agglutiner des microbes ou des globules pour les sensibiliser à l'action de l'alexine. Par exemple, des globules rouges de lapin, fortement agglutinés par du sérum de poule chauffé à 55°, ne sont nullement devenus plus accessibles à la légère action dissolvante que le sérum de cobaye neuf exerce sur eux. L'existence de l'agglutination n'implique donc pas for-

cément l'apparition d'une sensibilité particulière vis-à-vis de l'alexine. Ces questions nécessitent de nouvelles recherches.

CONCLUSIONS

I. — Le sérum d'animaux traités par du sang défibriné provenant d'un animal d'espèce différente manifeste des propriétés actives, consistant en ce qu'il agglutine et dissout avec énergie les globules semblables à ceux qu'on a injectés. Il est doué aussi, dans certains cas, du pouvoir de faire naître un précipité dans le sérum (ou le sang défibriné) semblable à celui qui a été introduit dans l'organisme.

II. — L'action dissolvante du sérum actif sur les globules est due à l'influence de deux substances ; l'une appartient en propre au sérum actif ; l'autre (alexine) est répandue aussi bien dans les sérums neufs que dans les sérums actifs. La première agit en sensibilisant les globules à l'action de la seconde. Ces faits doivent être étroitement rapprochés de ceux que nous avons établis pour ce qui concerne le choléra-sérum et le vibrion cholérique.

III. — L'injection de sérum antihématique à un animal neuf (de même espèce que celui dont le sérum actif provient) provoque chez cet animal l'apparition d'un pouvoir globulicide du sérum. La production de ce pouvoir globulicide doit être expliquée conformément à la manière de voir que nous avons émise en 1895, et qui est relative à la cause du pouvoir bactéricide constatable dans le sérum d'animaux injectés de choléra-sérum. Ce pouvoir globulicide apparaît, grâce à la rencontre, dans l'organisme, de la matière propre au sérum actif avec l'alexine que cet organisme possédait avant toute intervention.

IV. — Les matières antihématiques spécifiques, résistant à la température de 55° et qui caractérisent le sérum actif, se fixent avec énergie sur les globules qu'elles peuvent impressionner. Le lavage n'enlève pas aux globules les caractères (agglutination, sensibilisation à l'alexine) qu'ils ont acquis par le contact avec ces substances. L'analogie avec ce qui se passe pour les microbes est complète à ce point de vue encore.

V. — Les alexines de provenances diverses, lesquelles se comportent à peu près de même dans leur action sur un même

microbe (quelle que soit l'espèce animale qui les ait fournies) présentent entre elles des différences lorsqu'on les étudie au point de vue de leur action sur les globules. Par exemple, la sensibilisation de globules à l'action d'alexines de certains animaux n'implique pas nécessairement que ces globules soient devenus facilement destructibles sous l'influence de toutes les alexines.

VI. — Les sérums antihématiques présentent aussi un pouvoir antitoxique bien constatable : ils peuvent protéger les globules contre l'agglutination et la dissolution par un sérum neuf identique à celui qu'on a injecté aux animaux producteurs du sérum actif.

VII. — Il existe des analogies très nettes, au point de vue de l'action de la chaleur, entre les matières actives des sérums spécifiques et celles, douées de propriétés comparables, qui existent dans les sérums neufs ; il en existe aussi, à ce point de vue, entre celles qui influencent les microbes et celles qui impressionnent les globules rouges. L'action de la chaleur (60 à 70°) affaiblit la propriété agglutinante et la propriété sensibilisatrice.

VIII. — La destruction par l'alexine peut s'observer sur des globules qui n'ont pas été agglomérés. — Le fait que des globules sont agglomérés par un sérum n'implique pas nécessairement qu'ils sont sensibilisés à l'action des alexines.

DU MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ
VIS-A-VIS DU BACILLE PYOCYANIQUE

PAR LE Dr GHÉORGHIEWSKY (SAINT-PÉTERSBOURG).

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

En étudiant le mécanisme de l'immunité chez les cobayes vis-à-vis du bacille pyocyanique, M. Wassermann (1) conclut que la destruction des microbes introduits dans la cavité péritonéale se fait sans l'intervention des leucocytes. D'après ce savant, les bactéries, aussitôt après leur arrivée dans la cavité péritonéale, deviennent immobiles, se gonflent. et finissent par s'y dissoudre comme la cire dans de l'eau chaude. On constate rarement la transformation en granules, comme c'est le cas pour le choléra. Cette destruction de bactéries s'effectue assez rapidement. car déjà 6 heures après l'inoculation le contenu peritonéal ensemencé ne donne plus de culture. Quelquefois, cependant, on voit se développer des colonies isolées, mais celles-ci sont le plus souvent privées du pigment, ce qui, pour l'auteur, constitue un signe de dégénérescence des microbes.

M. Charrin (2), dans une série des travaux, a étudié le sort du bac. pyocyanique dans le corps d'animaux immunisés. Sans nier tout à fait l'importance de la phagocytose, c'est aux humeurs surtout, exerçant une action atténuante sur les microbes, qu'il attribue le rôle prépondérant dans la lutte de l'organisme.

Sans entrer dans l'analyse des arguments apportés par l'auteur à l'appui de sa conclusion, analyse qui a d'ailleurs déjà été faite en 1892, par M. Metchnikoff (*Semaine médicale*, p. 469; 1892), je dois mentionner un fait qui plaide, d'après M. Charrin, en faveur de l'action atténuante exercée sur les microbes par les humeurs des animaux immunisés : c'est que le bac. pyocyanique, ensemencé sur le sérum des animaux neufs (lapins), possède la propriété de fabriquer de la pyocyanine, tandis que cette

propriété fait défaut si on l'ensemence sur sérum des animaux immunisés.

Les idées qui viennent d'être exposées étant en contradiction avec ce que l'on sait sur l'immunité en général, à l'égard d'autres microbes, nous avons étudié, sur le conseil de M. Metchnikoff, le sort du bac. pyocyanique dans le corps d'animaux immunisés, afin d'éclairer, au point de vue du mécanisme de l'immunité, active et passive, les propriétés acquises par le sérum lors de l'immunisation contre le microbe.

De plus, le bac. pyocyanique étant aussi pathogène pour certains animaux à sang froid, comme l'ont démontré MM. Krel et Soetbeer (3), nous avons recherché si ces vertébrés inférieurs sont capables d'acquérir l'immunité, et, dans le cas positif, par quel mécanisme.

Nous nous sommes servi d'une culture du bac. pyocyanique donnée par M. Metchnikoff. 1/120 de la culture de 24 heures sur gélose, injectée dans le péritoine, tuait un cobaye de 300 gr. dans 18—24 heures.

Avant de décrire le sort du bacille pyocyanique introduit dans le corps de l'animal immunisé, je désire attirer l'attention sur quelques particularités observées au cours de l'infection pyocyanique ; j'étudierai également comment réagissent des cobayes neufs présentant une certaine résistance vis-à-vis du bac. pyocyanique, en présence d'une dose non mortelle de ce dernier.

Lorsqu'on injecte, dans le péritoine d'un cobaye neuf de 300 à 400 grammes, une dose mortelle du bac. pyocyanique (dans notre cas 1/100 de la culture de 24 heures sur gélose) et qu'on prélève à l'aide d'un tube effilé un peu de liquide péritonéal, voici ce qu'on observe. Dans les premiers moments qui suivent l'injection, les bactéries conservent leur mobilité et leur faculté de se colorer. Les leucocytes, moins nombreux qu'avant l'inoculation, sont presque exclusivement constitués par des mononucléaires. La phagocytose fait défaut. Quelquefois déjà au bout de 15 à 20 minutes, on peut observer une modification particulière des leucocytes qui nous a été indiquée par M. Metchnikoff : elle consiste en ce que certains leucocytes perdent leurs mouvements amiboïdes. A leur pourtour on voit apparaître un anneau clair, et, plus vers le centre, on voit des grains de protoplasma

réunis ; le corps du leucocyte devient transparent, sauf un point de la périphérie qui est le siège d'un petit amas de protoplasma granuleux. Au milieu de cette masse leucocytaire transparente, on aperçoit les contours du noyau, qui se présente aussi sous forme d'une vacuole claire. La coloration par le bleu de méthylène et l'éosine permet de constater que les noyaux des polynucléaires ayant subi les transformations décrites, augmentent de volume, se fusionnent en formant un noyau unique à forme arrondie ; ce noyau ne prend pas la couleur aussi bien que les noyaux des leucocytes sains ; il présente en plus l'aspect réticulé. Le protoplasma, qui existe en petite quantité, s'agglomère principalement sur un point quelconque de la périphérie, et se colore en rose clair par l'éosine. Le nombre de leucocytes ainsi transformés augmente de plus en plus. Au bout de 4 à 5 heures, l'exsudat contient déjà une quantité considérable de leucocytes qui presque tous viennent de subir cette transformation ; c'est à peine si l'on en trouve encore quelques-uns qui ont conservé leur aspect normal. La phagocytose est peu marquée ; les bactéries continuent à se multiplier en conservant leur mobilité et leur aspect extérieur ; la mort apparaît au milieu de ces phénomènes, 18 à 20 heures après l'inoculation.

On observe de la sorte au cours de l'infection pyocyanique ce phénomène intéressant que les leucocytes, mis en contact avec les bactéries, subissent une sorte de dégénérescence à l'intérieur même de l'organisme.

Un phénomène analogue a été décrit par Van de Velde (4) chez des lapins au cours de l'infection staphylococcique. En introduisant dans la cavité pleurale des cultures vivantes et virulentes de staphylocoques, Van de Velde a observé une dégénérescence analogue des leucocytes. Il a obtenu le même résultat en faisant arriver sur les leucocytes d'un lapin neuf une goutte d'exsudat péritonéal déterminé par une culture vivante de staphylocoques, et même, mais pas aussi nettement, avec la culture elle-même. M. Van de Velde en conclut que le staphylocoque élabore, notamment à l'intérieur de l'organisme, un poison particulier qui tue les globules blancs ; il appelle ce poison *leucocidine*.

Nous avons aussi réussi à réaliser la transformation des leucocytes en dehors de l'organisme dans une goutte pendante, en mélangeant les globules blancs de cobaye normal avec une goutte

de la culture pyocyanique de 24 heures sur gélose, ou bien avec une goutte d'exsudat péritonéal d'un cobaye ayant reçu la dose mortelle du bac. pyocyanique.

Cette transformation des leucocytes *in vitro* ne s'accomplit pas cependant aussi rapidement qu'avec le microbe de Van de Velde : elle n'apparaît qu'après 20 à 30 minutes du séjour de la goutte pendante à l'étuve à 36°; elle n'a pas lieu lorsqu'on mélange des leucocytes de cobaye neuf avec une goutte de la culture pyocyanique préalablement tuée à 80°, ou bien avec de de la toxine, même après 2 à 3 heures de séjour à l'étuve à 36° en goutte pendante. Elle n'a pas lieu non plus à l'intérieur même de l'organisme : quand on injecte dans le péritoine du cobaye une dose mortelle de toxine pyocyanique, l'animal meurt dans les 24 heures, et les leucocytes de la cavité péritonéale conservent dans ce cas leur aspect ordinaire. D'où nous avons conclu que cette modification et cette dégénérescence des leucocytes ne tient pas à la toxine du bac. pyocyanique causant la mort de l'animal.

Nous ne pouvons pas dire jusqu'à quel point cette modification leucocytaire est spécifique, et si elle peut avoir lieu en dehors de l'organisme sans l'intervention des microbes ; faisons seulement remarquer que cette dégénérescence et cette modification de l'aspect extérieur des leucocytes se produit dans l'organisme même au cours de l'infection pyocyanique.

Voyons maintenant comment les cobayes neufs, qui jouissent, comme nous le savons, d'une certaine immunité vis-à-vis du bac. pyocyanique, réagissent en présence de la dose non mortelle de ces bacilles.

Dans les premiers moments qui suivent l'injection de notre bacille (1/150 de la culture sur gélose) dans le péritoine des cobayes neufs, les phénomènes sont les mêmes que dans le cas de la dose mortelle. Les bactéries restent mobiles, conservent leur aspect et se colorent bien.

Au début, il y a peu de leucocytes, et ceux-ci sont presque exclusivement des mononucléaires ; il n'y a presque pas de phagocytose. Après 30 à 40 minutes, certains leucocytes perdent leurs mouvements amiboïdes, et se transforment en globules transparents, présentant un amas de protoplasma granuleux à la périphérie. Au bout de 2 à 3 heures, au moment où s'établit la leuco-

cytose, on voit quelques leucocytes subir la dégénérescence, tandis que d'autres commencent à englober les bactéries.

A ce moment on peut voir un grand nombre de bactéries à l'intérieur des polynucléaires.

La majorité des bactéries englobées conservent leur aspect extérieur et prennent bien les couleurs.

Quelques-unes cependant, — en petit nombre, — se colorent faiblement et d'une façon inégale par le bleu de méthylène ; en plus, on observe rarement à l'intérieur des leucocytes des bactéries se colorant en rouge par l'éosine; en même temps on peut observer à l'intérieur de certains leucocytes des bactéries transformées en granules prenant bien le bleu de méthylène. A côté de cela, l'on y trouve aussi, en dehors des cellules, quelques bactéries se colorant faiblement et transformées en granulations, mais cela tient à ce que, pendant que l'on fait la préparation, de nombreux leucocytes viennent à se détruire et à mettre ainsi en liberté des bactéries qu'ils contenaient.

La phagocytose était plus ou moins accentuée selon la dose des bactéries injectées, mais déjà au bout de 6 à 7 heures, la plupart du temps, lorsqu'on prélevait une goutte du contenu péritonéal, on n'y voyait plus de bactéries libres ; elles étaient toutes englobées par les leucocytes.

Au fur et à mesure que les bactéries venaient à être englobées, le nombre des leucocytes modifiés diminuait, et déjà 7-8 heures après l'inoculation il était très difficile d'en trouver. Le contenu de la cavité péritonéale était à ce moment formé d'une masse de leucocytes, presque exclusivement de polynucléaires, dont quelques-uns contenaient à leur intérieur tantôt des bactéries se colorant bien ou mal, tantôt des bactéries transformées en granulations ; le liquide péritonéal ensemencé donnait des cultures de B. pyocyanique qui, sur les milieux ordinaires, élaborait le pigment bleu. Mis à l'étuve à 36° en goutte pendante, le liquide péritonéal permettait de constater au bout de quelques heures la multiplication du B. pyocyanique contenu dans certains leucocytes.

Le lendemain, en examinant une goutte retirée de la cavité péritonéale, on ne pouvait plus constater des bactéries ni en dehors ni en dedans des leucocytes. Une goutte semblable ensemencée donnait lieu la plupart du temps à des colonies isolées,

produisant du pigment bleu. Les ensemencements faits après 48 heures ne donnaient habituellement plus de colonies, et restaient stériles.

Nous voyons donc que la résistance des cobayes neufs non immunisés vis-à-vis du B. pyocyanique se traduit par l'apparition de la réaction phagocytaire.

* * *

Pour étudier le sort du B. pyocyanique dans le corps des animaux activement et passivement immunisés, nous nous sommes principalement servi des cobayes, que nous avons immunisés pendant un temps assez long, en leur injectant dans le péritoine des cultures vivantes de 24 heures sur gélose : nous nous sommes aussi servi d'une chèvre, qui a été immunisée pendant de longs mois par des injections sous-cutanées de cultures vivantes de 24 heures sur gélose.

Le sérum des animaux ainsi immunisés avait acquis, outre la propriété préventive (propriété de conférer l'immunité passive à un autre animal), encore d'autres propriétés *in vitro* qui le distinguaient du sérum des animaux de même espèce, mais non immunisés. C'est de l'étude de ces propriétés et de leur signification pour l'immunité que nous allons maintenant nous occuper.

M. Wassermann fait remarquer, dans son travail, que le sérum des animaux immunisés contre le B. pyocyanique ne possède pas *in vitro* des propriétés bactéricides vis-à-vis de ce microbe.

Nous avons pu nous assurer également que le B. pyocyanique pousse très bien dans le sérum des animaux immunisés contre lui, conserve sa forme, sa colorabilité et sa virulence : seulement il donne des colonies agglutinées.

Lorsqu'on prend une culture de 24 heures ayant poussé dans le sérum préventif des cobayes ou de la chèvre, et que l'on repique ensuite sur la gélose, il est facile de s'assurer que la virulence de notre microbe n'est nullement modifiée après le passage *in vitro* par le sérum des animaux immunisés. En un mot notre sérum préventif n'exerçait *in vitro* aucune action nocive sur le B. pyocyanique, n'arrêtait pas son développement et ne diminuait pas sa virulence.

Le sérum des cobayes et des lapins immunisés contre le B.

pyocyanique acquiert la propriété d'agglutiner ce bacille (le sérum neuf de ces animaux n'agglutine pas) ; quant au sérum de chèvre qui agglutine déjà faiblement (1 : 10) le B. pyocyanique à l'état normal, il devient au cours d'immunisation fortement agglutinant. Le pouvoir agglutinant des sérums des animaux immunisés variait avec l'espèce animale ; ainsi, le sérum préventif de la chèvre agglutinait une culture du B. pyocyanique de 24 heures sur gélose à la dose de 1 : 10,000 ; le sérum préventif des lapins à la dose de 1 : 2.000, 1 : 4.000 ; le sérum préventif des cobayes à la dose de 1 : 200, 1 : 600.

Ayant de la sorte à notre disposition des sérums de pouvoir agglutinant variable, il a été intéressant de voir les rapports qui existent entre le pouvoir préventif et le pouvoir agglutinant. A cet effet, nous avons pris du sérum préventif de la chèvre présentant le maximum du pouvoir agglutinant (1 : 10 000), et du sérum préventif de lapin dont le pouvoir d'agglutiner est moindre (1 : 2,000), et nous avons étudié comparativement leur action préventive sur les cobayes.

De nombreuses expériences nous ont montré que le sérum de la chèvre, bien qu'il fût plus agglutinant, se montrait toujours moins préventif que celui de lapin. Le résultat était le même lorsque nous nous servions, pour notre expérience, du sérum frais, non chauffé, au lieu de sérum préalablement chauffé à 55° pendant une heure. Nous avons obtenu des résultats analogues, bien que moins nets, en comparant le pouvoir préventif du sérum de la chèvre avec celui de cobaye, dont la propriété agglutinante était beaucoup inférieure (1 : 200) ; dans beaucoup d'expériences, nous avons pu voir que l'effet préventif des deux sérums était le même, et dans certains cas le sérum de cobayes se montrait même plus préventif que celui de la chèvre. Il en ressort donc que la propriété des sérums d'agglutiner le B. pyocyanique ne marche pas parallèlement avec leur propriété préventive.

M. Charrin constate ce fait dont il a déjà été question plus haut, que le B. pyocyanique se développant sur sérum d'animal neuf (lapin) commence au bout d'un certain temps (6-7 jours) à fabriquer un pigment bleu, la pyocyanine, tandis que le même bacille ensemencé sur le sérum d'un lapin immunisé ne donne point de pigment, et en ceci l'auteur voit la preuve de l'action

destructive des humeurs des animaux immunisés sur le microbe.

Nous pouvons confirmer l'observation de M. Charrin ; en effet, le B. pyocyanique ensemencé sur le sérum de nos cobayes immunisés n'élaborait pas de pigment, même au bout de 1-2 mois, tandis que celui-ci apparaissait déjà après 4-5 jours sur sérum des cobayes neufs. De plus, il a suffi d'ajouter au sérum des cobayes neufs un peu de sérum provenant d'un cobaye immunisé, pour empêcher l'élaboration du pigment bleu chez le B. pyocyanique poussant dans ce mélange.

Voyons maintenant quelle est la cause de ce phénomène. Peut-on le considérer comme indiquant la dégénérescence du microbe, et en quel rapport ce phénomène se trouve-t-il avec l'immunité?

Je vais décrire d'abord quelques procédés techniques dont je me suis servi pour surprendre à son début la formation du pigment dans le sérum donné. Une solution de gélose dans de l'eau distillée à 1,5 0/0, filtrée et stérilisée, après avoir été refroidie jusqu'à 40°, était additionnée d'un volume égal du sérum à examiner ; nous abandonnions le mélange du sérum et de la gélose dans un tube incliné. Quand le B. pyocyanique, en cultivant sur ce milieu, commençait à former le pigment bleu, le contenu du tube prenait peu à peu la couleur verte foncée. Afin de s'assurer que cette couleur tenait à la présence de la pyocyanine, il suffisait de fondre la gélose par le chauffage, de la refroidir jusqu'à 40° et d'extraire le pigment avec du chloroforme.

De nombreuses expériences m'ont montré que le moment de l'apparition du pigment bleu sur ce milieu coïncidait avec celui que l'on observait dans le sérum correspondant, non additionné de gélose.

M. Gessard (5) affirme que le B. pyocyanique, mis dans un milieu purement albuminoïde, n'élabore pas le pigment bleu, mais seulement un pigment verdâtre.

En ensemençant notre microbe sur des sérums de différents animaux neufs, non immunisés, nous avons remarqué qu'en effet, pendant les premiers jours, il se forme seulement un pigment verdâtre, puis au bout d'un certain temps, variable selon l'espèce animale, apparaissait le pigment bleu. Ainsi, celui-ci apparaît après 4-6 jours, le B. pyocyanique étant ensemencé sur du sérum de cobaye neuf ; il apparaît dans 6-9 jours, l'ensemencement

étant fait sur du sérum de lapin neuf; quant au sérum de chèvre, même après deux mois, nous n'avons pas vu le pigment se former. Lors d'ensemencements sur l'albumine d'œuf, le pigment faisait défaut la plupart du temps : quelquefois il apparaissait, mais très tard, au bout de 24-28 jours. Le pigment faisait totalement défaut pendant deux mois sur du sérum des animaux immunisés contre le B. pyocyanique (soit avec des cultures vivantes ou chauffées à 80° pendant 30 minutes, soit avec la toxine obtenue par le procédé de Wassermann), ainsi que dans le mélange du sérum neuf de cobaye avec du sérum d'un animal immunisé. Mais il suffisait de prendre une culture de pyocyanine, même vieille de 20-30 jours, ayant poussé sur du sérum spécifique, et la transporter dans un milieu ordinaire, pour voir apparaître le pigment bleu dans l'espace du temps qui lui est ordinairement nécessaire. Ceci nous prouvait que le B. pyocyanique, du fait d'avoir poussé sur du sérum d'animaux immunisés, n'a nullement perdu sa propriété de produire son pigment, et que celle-ci n'a pas même été diminuée. De plus, il suffit d'ajouter au sérum de l'animal immunisé, ainsi qu'à l'albumine de l'œuf, quelques gouttes d'une solution stérilisée de peptone, pour constater le lendemain la présence de la pyocyanine. On obtient le même résultat quand, au lieu de la peptone, on ajoute une petite quantité de papayotine rendue stérile par la filtration à travers la bougie Chamberland. La papayotine, en peptonisant l'albumine, fournissait ainsi le matériel pour la fabrication du pigment bleu.

Nous avons constaté ensuite que si on coagule l'albumine d'œuf, ou le sérum de nos animaux immunisés, dans un tube à essai en les chauffant à 75°, et si ensuite on y ensemence notre microbe, celui-ci ne pousse pendant les premiers jours qu'à la surface de l'albumine coagulée et ne donne pas de pigment; puis, après 4 à 6 jours, l'albumine coagulée commence à se liquéfier, et le pigment bleu paraît alors aussitôt. Nous avons conclu que le B. pyocyanique, en poussant sur le milieu albuminoïde, est capable de peptoniser l'albumine, et que c'est précisément pour cette raison que, quelquefois, ensemencé dans un milieu purement albuminoïde, il ne se met à élaborer le pigment bleu qu'après un certain intervalle ; ensemencé dans un milieu contenant de la peptone, il fabrique le pigment d'une façon habi-

tuelle. Mais on peut se demander maintenant pourquoi le B. pyocyanique ne peptonise pas d'une façon égale l'albumine de tous les sérums, et pourquoi il n'est pas capable de peptoniser lorsqu'il s'agit des sérums (ou bien d'œdème) des animaux immunisés, après avoir pu peptoniser les mêmes sérums avant l'immunisation ? Nous ne pouvons pas répondre actuellement à cette question. Il est évident qu'il faut en chercher la cause dans les modifications que subit dans sa constitution le sérum sous l'influence de l'infection. Tout en ignorant la nature de ces modifications nous pourrons cependant prouver que cette nouvelle propriété acquise par le sérum *in vitro* n'atténue guère la virulence de notre bacille, n'a aucun rapport ni avec le pouvoir préventif de nos sérums ni avec la résistance qu'ont présentée nos animaux immunisés vis-à-vis de ce microbe.

Nous avons déjà vu qu'à la suite du passage de notre bacille *in vitro* par le sérum de l'animal immunisé, sa virulence n'a été nullement diminuée. J'ai déjà mentionné, en plus, que le B. pyocyanique, ensemencé sur du sérum neuf de chèvre, ne donne pas de pigment bleu, même au bout de deux mois, et cependant ce sérum ne jouissait d'aucun pouvoir préventif vis-à-vis du B. pyocyanique, même à dose considérable : 3 c.c.

Le cobaye qui avait reçu la veille sous la peau 2-3 c.c. de ce sérum fournissait, 24 heures après, un sérum sur lequel le B. pyocyanique poussait sans former de pigment ; quant au cobaye lui-même, il ne devenait pas, comme nous l'avons déjà dit tout à l'heure, sensiblement plus résistant à la suite de l'injection de ce sérum. Enfin, quand on injectait à un cobaye immunisé une dose de culture qui le tuait, son sérum n'en cessait pas moins de manifester la propriété acquise au cours de l'immunisation.

M. Denys (1) a observé ce fait que le sérum des lapins immunisés contre les staphylocoques possède la propriété de neutraliser *in vitro* l'action de la leucocidine de Van de Velde sur les leucocytes d'un lapin neuf : il a appelé cette substance neutralisante : antileucocidine.

Dans l'infection pyocyanique, il existe aussi, comme nous l'avons vu, une dégénérescence des leucocytes, venant en contact avec les microbes, et cela à l'intérieur de l'organisme. Il était intéressant de savoir si le sérum de nos animaux immu-

nisés n'acquiert pas la propriété d'empêcher, *in vitro*, l'action destructive exercée par les B. pyocyaniques vis-à-vis des leucocytes.

En ajoutant à des leucocytes d'un cobaye neuf un peu de sérum d'un animal immunisé et une goutte de culture, nous avons constaté que notre sérum préventif n'empêchait nullement la dégénérescence leucocytaire, laquelle parfois survenait même plus rapidement que lorsqu'il n'y avait pas de sérum. Les mêmes résultats négatifs étaient à observer lorsque, au lieu de sérum préventif, nous employions le sérum antitoxique des cobayes ou de la chèvre.

M. Wassermann, en constatant que le sérum des animaux immunisés contre le B. pyocyanique ne possède *in vitro* aucun pouvoir bactéricide, suppose que ce pouvoir apparaît seulement dans l'organisme, après que l'on y a introduit le sérum préventif, et que c'est grâce à ce pouvoir bactéricide que se fait, dans l'organisme, la dissolution des bactéries en dehors des cellules.

Pour voir quel est le mode d'action de notre sérum préventif dans l'organisme, nous avons fait l'expérience suivante : nous avons introduit, dans la cavité péritonéale d'un cobaye bien immunisé avec des cultures vivantes, un sac en collodion avec toutes les précautions d'asepsie : ce sac était préalablement rempli du sérum préventif de la chèvre, dans lequel nous avons ensemencé notre microbe.

Trois jours après, en ouvrant la cavité péritonéale, nous avons vu le sac entouré des fausses membranes et des leucocytes ; son contenu était trouble. L'examen microscopique a montré que ce trouble était dû à quantité de colonies agglutinées du B. pyocyanique. Les microbes ont conservé leur aspect normal, ainsi que la faculté de se colorer et leur virulence, ce dont on a pu s'assurer par les procédés ordinaires.

D'où nous avons pu conclure que, même dans l'organisme, le sérum des animaux immunisés n'exerce, vis-à-vis du B. pyocyanique, aucune action ni bactéricide ni atténuante.

Comment se fait donc la destruction du B. pyocyanique dans l'organisme des animaux immunisés ? Pour répondre à cette question, voyons ce que deviennent les microbes lorsqu'on les

injecté sous la peau ou dans le péritoine d'un animal bien immunisé.

Quand on injecte à un cobaye bien immunisé une dose, non mortelle pour lui, de culture pyocyanique de 24 heures sur gélose, voici ce que l'on observe en examinant le liquide péritonéal. Pendant les premiers moments qui suivent l'inoculation, l'examen en goutte pendante montre les bactéries en dehors des cellules, immobiles, et déjà en certains endroits agglutinées en petits amas pendant les 30 à 40 secondes nécessaires pour faire la préparation en goutte pendante. Cette agglutination augmente rapidement et devient très nette, déjà au bout de quelques minutes du séjour du liquide en goutte pendante. Les bactéries présentent toutes leur aspect normal, mais elles semblent un peu plus trapues, un peu épaissies. On n'observe pas de transformation en granules. Les leucocytes sont peu nombreux et non modifiés. En faisant des préparations colorées, on voyait qu'ils sont presque tous des mononucléaires, et ne contiennent pas à l'intérieur des bactéries. Quelquefois, mais rarement, on voit des polynucléaires ayant englobé des bactéries. Certaines de ces bactéries englobées se colorent mal et d'une façon inégale, d'autres sont transformées en boules, mais la plupart continuent à prendre bien les couleurs, tout en conservant leur forme ordinaire. Les bactéries qui restent en dehors des leucocytes conservent également presque toutes leur forme et leur colorabilité normales.

Nous n'avons jamais pu observer la transformation totale de la grande partie des microbes en boules — en dehors des cellules, comme cela a lieu dans le choléra. Il est vrai que déjà, dans les premiers moments après l'inoculation, on peut remarquer, sur les préparations colorées, en dehors des leucocytes, des bactéries qui se colorent mal et sont même transformées en boules ; mais rien ne nous prouve que ce ne soient pas les bactéries ayant déjà séjourné à l'intérieur des leucocytes et échappées des leucocytes détruits au moment où l'on faisait la préparation. Bien qu'on puisse admettre qu'en injectant la culture dans la cavité péritonéale, certaines bactéries plus faibles seraient transformées en boules par les substances provenant de la destruction de leucocytes qui a toujours lieu dans ce cas, qu'il se produirait, pour ainsi dire, un phénomène de Pfeiffer

incomplet, nous avons des preuves que cette transformation des bactéries s'effectue dans notre cas, non sans intervention des leucocytes, et notamment dans l'intérieur de ces derniers. Cette transformation des bactéries ne s'observe pas lorsqu'on mélange *in vitro* une goutte de notre culture avec du sérum d'un animal solidement immunisé : mais il suffit d'ajouter à ce mélange un peu des leucocytes d'un cobaye immunisé, ou même d'un cobaye neuf, pour voir, quelques minutes après, sur des préparations colorées, une quantité de bactéries à l'intérieur des leucocytes, et ces bactéries en grande partie déjà transformées en boules. Remarquons que ce phénomène est surtout net lorsqu'on ajoute des leucocytes d'un animal immunisé.

Au bout de 20 à 30 minutes après l'injection de la culture, quelques leucocytes commençaient à perdre leurs mouvements amiboïdes et à présenter cette transformation de leur aspect extérieur que nous avons signalée chez des cobayes non immunisés.

Au bout de deux heures environ apparaissait la leucocytose : les leucocytes englobaient rapidement les bactéries, de sorte que, après 3 à 4 heures, on ne pouvait plus constater, dans une goutte retirée de la cavité péritonéale, des bactéries libres en dehors des cellules ; toutes se trouvaient à l'intérieur des polynucléaires. Une partie de ces bactéries prenaient bien les couleurs et conservaient leur forme, d'autres se coloraient mal et inégalement, d'autres enfin étaient transformées en boules. On en trouvait parfois qui se coloraient par l'éosine en rouge. Quand on mettait un peu de cet exsudat en goutte pendante à l'étuve à 37°, on pouvait constater que les bactéries, se trouvant à l'intérieur des leucocytes, commençaient à se multiplier et à donner des colonies, d'où il faut conclure qu'elles ont été englobées à l'état vivant.

Plus on s'éloignait du moment de l'inoculation, plus les leucocytes, contenant à leur intérieur des bactéries, devenaient rares, et déjà au bout de 5 à 6 heures il était difficile d'en trouver. Le nombre des leucocytes transformés diminuait à mesure que les bactéries étaient englobées, et ils disparaissaient presque totalement 6 à 7 heures après l'inoculation. Alors que les préparations colorées ne montraient plus de microbes, les ensemencements dans des milieux ordinaires donnaient encore pendant

24 à 30 heures des colonies isolées de B. pyocyanique, capable de donner un bon pigment.

Lorsqu'on sacrifiait le cobaye après que l'examen du liquide péritonéal ne faisait plus voir de microbes, ni en dedans ni en dehors des leucocytes, on remarquait sur les parois de la cavité péritonéale, surtout sur le foie et le grand épiploon, des petits amas blancs, se détachant facilement, et formés de leucocytes, surtout de polynucléaires : au milieu et à l'intérieur de ces derniers, on pouvait voir des bactéries en partie bien conservées, en partie déjà dans différents stades de destruction. En ensemençant ces amas blancs, on obtenait toujours des cultures donnant le pigment bleu. En fixant des fragments du grand épiploon, du foie et d'autres organes de la cavité péritonéale, nous avons vu, après les avoir inclus dans la paraffine et préparé des coupes, un amas des éléments cellulaires sous la couche péritonéale ; dans différents endroits, on pouvait voir des bactéries, qui tantôt avaient conservé leur forme, tantôt présentaient différents stades de destruction.

24 à 30 heures après l'inoculation, les amas leucocytaires devenaient plus rares à la surface péritonéale, et il était difficile d'y voir des bactéries. Après 2 à 3 jours, on pouvait constater par places, sous le revêtement péritonéal, des petits points blancs : c'était des amas des globules blancs ; ils étaient surtout nombreux sous le revêtement péritonéal du grand épiploon, puis sous celui du foie, des intestins et d'autres organes, plus rares sur la paroi péritonéale. Le contenu de la cavité péritonéale ne donnait alors plus de colonies en milieux ordinaires, mais lorsqu'on ensemençait le contenu des amas cellulaires sous-péritonéaux, on obtenait presque toujours des colonies de B. pyocyanique fournissant du pigment bleu. L'examen des coupes nous a montré que ces amas d'éléments cellulaires se trouvent dans le tissu cellulaire sous-péritonéal ; nous n'avons pas toujours réussi à y constater la présence des bactéries. Quelquefois, en injectant à des cobayes neufs ou immunisés, dans le péritoine, une dose étant à la limite de la dose sûrement mortelle et de la dose non mortelle, on provoquait la mort dans 3 à 5 jours. Dans ces cas, il était la plupart du temps impossible de trouver des microbes dans le sang du cœur ; quant au contenu péritonéal, quelquefois, ensemencé en milieux ordinaires, il donnait des

cultures, d'autres fois il n'en donnait pas; mais dans tous les cas, sans exception, il existait, sous toute la couche péritonéale, notamment sous celle du foie et du grand épiploon, une quantité considérable d'abcès dont le contenu donnait toujours des colonies du B. pyocyanique.

Remarquons que nulle part, dans les organes ou d'autres parties du corps, nous n'avons constaté de pareils amas cellulaires, dont le siège constant est le tissu sous-péritonéal.

De tout ceci on peut conclure que lorsque après avoir injecté des cultures du b. pyocyanique dans le péritoine des cobayes, nous ne constatons plus sur les préparations colorées la présence des microbes, cela ne veut point dire que tous les microbes injectés sont déjà détruits; loin de là : une partie de ceux-ci se dépose avec des leucocytes à la surface péritonéale; une autre partie est entraînée par les phagocytes dans le tissu cellulaire sous-péritonéal, et c'est là que se poursuit la lutte entre les bactéries et l'organisme au moyen des éléments cellulaires, et ce sont quelquefois les bactéries qui en sortent vainqueurs.

En injectant le B. pyocyanique dans le péritoine d'un cobaye passivement immunisé, — par une injection préalable sous la peau d'une certaine dose de sérum préventif (ce sérum n'est pas antitoxique dans notre cas), — nous avons observé la même lutte de l'organisme contre les bactéries que chez le cobaye activement immunisé. Nous n'avons jamais constaté ni la dissolution des bactéries dans les humeurs de l'organisme, ni leur transformation totale en boules en dehors des phagocytes. Par contre, la résistance que présentait l'animal était toujours en raison directe de la rapidité d'apparition et du degré de la réaction phagocytaire.

On peut faire ressortir l'importance de la rapidité de l'apparition de la phagocytose, — au point de vue de l'immunité active aussi bien que passive — en narcotisant l'animal immunisé, par une injection souscutanée d'opium, avant de lui injecter le B. pyocyanique dans le péritoine. La narcose obtenue par l'opium, comme cela ressort du travail de M. Cantacuzène, retarde la diapédèse, tout en conservant aux leucocytes leur sensibilité tactile et leur mobilité. Lorsqu'on prend deux cobayes du même poids, immunisés au même degré, — passivement ou activement, — et que l'on injecte à un d'eux sous la peau de la teinture d'opium (1 c. c.

pour 200 grammes d'animal), puis dans le péritoine une dose non mortelle pour eux du B. pyocyanique, on constate toujours que la réaction phagocytaire du cobaye narcotisé est moins prononcée que chez l'autre servant de témoin. Les bactéries demeuraient donc chez le cobaye narcotisé longtemps en dehors de cellules, elles se multipliaient, et bien que, la narcose terminée (après 4 à 5 heures), elles devenaient parfois toutes la proie des phagocytes, l'animal succombait. Ainsi, il suffit de retarder la diapédèse par l'injection de l'opium, de retarder l'apparition de la phagocytose, pour que l'animal perde son immunité, bien que les propriétés acquises par ses humeurs au cours de l'immunisation n'aient subi aucun changement.

Pour étudier le sort du B. pyocyanique sous la peau des animaux immunisés, nous nous sommes adressé à une chèvre et à des cobayes; la chèvre avait reçu pendant longtemps sous la peau des cultures vivantes; son sérum injecté sous la peau préservait, à la dose de 0,1 c. c., un cobaye de 300 grammes contre la dose sûrement mortelle du B. pyocyanique; quant aux cobayes vaccinés aussi avec des cultures vivantes, leur sérum était préventif dans les mêmes conditions à la dose de 0.05 c. c. à 0,1 c. c.

En injectant à nos animaux, sous la peau, le B. pyocyanique (une culture entière de 24 heures sous la peau de la chèvre, 1/40 à 1/20 de la culture aux cobayes), on voit déjà, dès les premiers moments, dans le liquide retiré du point d'inoculation, les bactéries immobilisées et en partie agglutinées. Les bactéries demeurent en dehors des cellules pendant 1 à 1/2 heure, en conservant leur aspect ordinaire ainsi que leur aptitude à se colorer. Les leucocytes sont peu nombreux, presque tous des mononucléaires ; il n'y a pas de phagocytose.

Après 2 heures ou 2 heures et demie, les leucocytes commencent à affluer au point d'injection des bactéries et de les englober. Au bout de 3 heures, la phagocytose est déjà très accusée, on peut observer toutes les modifications ordinaires des bactéries, mais toujours à l'intérieur des leucocytes polynucléaires. Au bout de 10 à 15 heures, toutes les bactéries sont englobées par les polynucléaires, on ne voit plus de bactéries libres dans la goutte pendante. Celle-ci, étant mise à l'étuve, donne lieu au

développement de colonies ayant pour origine les bactéries englobées par les leucocytes.

Une partie des leucocytes affluant au point d'injection du B. pyocyanique subit tout d'abord, tant que tous les microbes ne sont pas englobés, les modifications que nous avons signalées lorsqu'on inocule les cobayes dans le péritoine, c'est-à-dire ils perdent leurs mouvements amiboïdes et se transforment en globules transparents. Au point d'injection on constate, au bout de 24 heures, une petite induration; au bout de 48 heures, un abcès. Sur des préparations colorées faites avec une goutte de cet abcès, on ne constate plus de microbes, et cependant, ensemencé dans des milieux nutritifs, son contenu donne des colonies du B. pyocyanique encore pendant assez longtemps, pendant 15 jours, par exemple, chez notre chèvre.

Nous n'avons donc jamais pu observer la destruction extracellulaire des bactéries lors d'injections sous-cutanées : cette destruction se faisait par contre à l'intérieur des cellules pendant la réaction phagocytaire de l'organisme. Nous avons pu constater ceci aussi par une autre voie, notamment en faisant des coupes de parcelles de peau et du tissu cellulaire sous-cutané au point où a été pratiquée l'inoculation.

Passons maintenant à une autre question. Les animaux à sang-froid — les grenouilles en particulier — sont-ils capables d'acquérir l'immunité active et passive, et, si oui, sur quoi cette immunité est-elle basée?

Je me suis servi des grenouilles vertes, — *rana viridis*. En les habituant peu à peu à la température de l'étuve, 30 à 37°, je pouvais tuer après cela, avec 1/40 de la culture de 24 heures sur gélose, une grenouille de 15-18 grammes en 16 à 24 heures ; à l'autopsie, on trouvait des bactéries dans tous les organes aussi bien que dans le sang du cœur. Pour tuer une grenouille à la température ordinaire, il a fallu des doses plus considérables, — 1/5 de culture. Nous avons remarqué, en plus, que les toxines étaient sans action sur elle, même à la dose de 2 à 3 c. c. tandis que 1 c.c. de cette toxine tuait un cobaye de 300 grammes dans les 24 heures.

En injectant tous les 4 à 7 jours, dans le sac lymphatique des grenouilles habituées au séjour à l'étuve à 30°, des doses considérables de cultures chauffées à 80°, on remarquait qu'au bout

d'un certain temps, 3 à 4 semaines, les grenouilles devenaient plus résistantes à l'égard de notre bacille que le témoin placé dans les mêmes conditions ; les grenouilles acquéraient donc un certain degré d'immunité ; mais celle-ci était la plupart des cas assez faible. Une grenouille immunisée pouvait bien supporter une dose sûrement mortelle ou bien une dose et demie, mais succombait à la suite d'une dose deux fois mortelle. De plus, lorsqu'on injectait, à une grenouille accoutumée à 30-31°, du sérum préventif dans le sac lymphatique pour lui conférer l'immunité passive, nous avons remarqué ceci : quand le sérum a été injecté en même temps (2-3 c. c.) que la dose mortelle, ou 2 à 4 heures avant la culture pyocyanique, la grenouille, loin de devenir plus résistante, succombait quelquefois même plus rapidement que le témoin.

Le sérum préventif, injecté 24 heures avant la dose mortelle, donnait des résultats irréguliers. Les résultats étaient plus favorables lorsque le sérum était injecté 48 heures avant ; dans ce cas, on pouvait constater une certaine immunité. Ainsi, en injectant, dans le sac lymphatique d'une grenouille de 16 grammes, 0, 3 c. c. de sérum préventif (ce sérum préservait un cobaye de 300 grammes à la dose de 0, 2 c. c. en injection sous-cutanée contre une dose une fois et demie mortelle injectée 24 heures après dans le péritoine), on la préservait contre 1/30 de la culture qui tuait dans les mêmes conditions le témoin déjà à la dose de 1/40 dans les 24 heures. Nous pourrons donc conclure que la grenouille est capable d'acquérir à un certain degré l'immunité active et passive vis-à-vis du B. pyocyanique, mais que celle-ci se développe chez elle lentement.

Voyons maintenant sur quoi est basée sa résistance naturelle aussi bien que sa résistance acquise, qu'il s'agisse de l'immunité active ou passive.

Remarquons tout d'abord que le liquide lymphatique de la grenouille, neuve ou immunisée, présente *in vitro* un milieu de culture excellent pour le B. pyocyanique. Au cours de l'immunisation, ce liquide acquiert la propriété *in vitro* d'agglutiner le B. pyocyanique, mais assez faiblement (1 : 20-1 : 30).

Nous avons pu nous assurer que l'agglutination seule, au cours de l'immunité passive, n'est d'aucune utilité pour la grenouille. En effet, en injectant à une grenouille, dans le sac

lymphatique, une dose simplement mortelle déjà agglutinée dans une quantité considérable de sérum préventif de chèvre (dont le pouvoir agglutinant était 1 : 1000), on déterminait la mort, et quelquefois plus rapidement que chez le témoin. Il faut par conséquent d'autres éléments que l'agglutination pour que la grenouille devienne plus résistante.

Lorsqu'on injecte à une grenouille, neuve ou vaccinée, dans le sac lymphatique, une dose non mortelle du bacille pyocyanique, et que l'on retire de temps à autre une goutte du liquide lymphatique, voici ce qu'on observe. Dans les premiers moments, la plupart des bactéries se trouvaient en dehors des cellules en conservant bien leur forme, sans se transformer en granulations; très rapidement elles se répandaient dans tout le corps à l'aide du système lymphatique; une partie des bactéries se colorait déjà dès les premiers moments en rouge par l'éosine, et ce phénomène était parfois très prononcé; mais il n'était pas en raison directe de la résistance que présentait la grenouille vis-à-vis du microbe, car il présentait le même caractère chez la grenouille neuve ainsi que chez la vaccinée.

On constatait le même phénomène en dehors de l'organisme, en mélangeant le sérum (provenant du liquide lymphatique) dépourvu de leucocytes, avec une culture pyocyanique de 24 heures. Très rapidement, déjà dans les premiers moments qui suivent l'inoculation, quelques phagocytes commencent à englober les bactéries, qui subissent à leur intérieur les changements habituels, c'est-à-dire prennent mal les couleurs et d'une façon inégale, et se transforment en boules.

Plus tard, la réaction phagocytaire s'accroît, et au bout de 15 à 20 heures toutes les bactéries se trouvent déjà à l'intérieur des cellules. Nous avons pu nous assurer, par le procédé ordinaire, que les bactéries ont été englobées à l'état vivant. Puis, les leucocytes contenant des bactéries deviennent de plus en plus rares, et déjà 48 heures après l'inoculation on ne voit plus de bactéries ni en dedans ni en dehors des cellules.

Cependant, les ensemencements faits avec le liquide lymphatique donnaient encore longtemps des colonies, jusqu'à 15 à 18 jours après.

Faisons remarquer que nous n'avons pas observé chez les grenouilles la dégénérescence des leucocytes que nous avons

décrite chez les cobayes lors de l'infection pyocyanique. Les grenouilles succombaient à l'inoculation du bacille pyocyanique sans que leurs leucocytes aient perdu leurs mouvements amiboïdes ou leur aspect extérieur normal.

Nous voyons donc que la résistance de la grenouille vis-à-vis du bacille pyocyanique se traduit de la même façon que chez les animaux à sang chaud, c'est-à-dire par la réaction phagocytaire de l'organisme.

CONCLUSIONS

1) Au cours de l'infection pyocyanique, on observe chez les cobayes un changement d'aspect extérieur et une dégénérescence des leucocytes se trouvant en contact avec les bactéries dans l'organisme ; le phénomène est le même, qu'il s'agisse des animaux neufs ou vaccinés.

On peut le constater aussi *in vitro*, en dehors de l'organisme, en mélangeant des leucocytes avec la culture du bacille pyocyanique. Le sérum des animaux immunisés, soit préventif, soit antitoxique, n'empêche point ce changement des leucocytes de se faire en dedans ou en dehors de l'organisme.

2) Le pouvoir agglutinant du sérum, apparaissant au cours de l'immunisation, ne présente pas de parallélisme avec le pouvoir préventif.

3) La faculté du bacille pyocyanique, ensemencé en milieu purement albuminoïde, de donner parfois au bout d'un certain temps le pigment bleu, tient très probablement à son pouvoir peptonisant. Le sérum de certains animaux acquiert, au cours de l'immunisation, la propriété d'empêcher ce bacille de peptoniser l'albumine. Mais cette propriété du sérum n'est pas spécifique, n'a pas de rapports directs avec son pouvoir préventif ni avec la résistance que présente l'animal immunisé vis-à-vis du bacille en question.

4) Le sérum des animaux vaccinés contre le bacille pyocyanique ne possède pas *in vitro* de propriétés bactéricides appréciables. Nous n'avons pu non plus constater ces propriétés dans le corps des animaux vaccinés.

5) Chez les animaux bien immunisés contre le bacille pyocyanique, la destruction de celui-ci sous la peau, aussi bien que dans la cavité péritonéale, s'accomplit à l'intérieur des phagocytes.

Nous n'avons jamais constaté chez ces animaux la destruction extracellulaire, comme c'est le cas dans le choléra (phénomène de Pfeiffer).

6) Lorsqu'on injecte des cultures du bacille pyocyanique dans le péritoine des cobayes, la lutte entre les phagocytes et les bactéries se passe d'abord dans le liquide péritonéal; quand toutes les bactéries libres sont englobées, elles sont transportées dans le tissu cellulaire sous-péritonéal, où elles subissent la destruction ultérieure par les éléments cellulaires.

7) Chez tous nos animaux, immunisés et neufs, la résistance vis-à-vis du bacille pyocyanique s'est toujours traduite par la réaction phagocytaire de leur organisme. Le sérum préventif avait pour effet de favoriser l'apparition de cette réaction.

8) La grenouille est capable d'acquérir l'immunité active et passive, mais cette immunité se développe lentement et est peu prononcée.

9) La destruction du bacille pyocyanique chez la grenouille s'effectue comme chez les animaux à sang chaud, c'est-à-dire à l'aide des éléments phagocytaires de l'organisme.

* * *

En terminant notre travail, nous tenons à cœur d'exprimer notre vive reconnaissance à M. le professeur Metchnikoff, pour le sujet d'études qu'il nous a proposé, ainsi que pour les conseils qu'il nous a prodigués au cours de nos recherches.

---

1. Wassermann, *Zeitsch. f. Hyg.* 1896, Bd. 22.
2. Charrin, *Comptes rendus de la Soc. de Biolog.* 1890.
3. Krehl et Soetbier, *Archiv. f. exp. Pathol.* 1898. Tome XL, p. 225.
4. Van de Velde, *La Cellule*, 1894. Tome X (?).
5. Gessard, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.
6. Denys, *La Cellule*. Tome XI.
7. Cantacuzène, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, nº 4.

ÉTUDES SUR LA PESTE BOVINE

Par MM.

NICOLLE
Directeur de l'Institut impérial
de bactériologie de Constantinople

ADIL-BEY
Chef de laboratoire.

PREMIER MÉMOIRE

On sait que, de temps immémorial, la peste bovine fait les plus grands ravages dans l'Empire ottoman. Son Excellence Sélim Pacha Melhamé, ministre de l'Agriculture, justement ému par les pertes considérables que le typhus contagieux occasionne encore à l'heure actuelle dans de nombreux vilayets, nous a chargés en 1897 d'étudier cette importante question. Nous nous sommes immédiatement mis à l'œuvre, et nous avons continué nos recherches depuis cette époque. Des travaux importants, notamment ceux de MM. Kolle et Turner, ont paru pendant le cours de nos expériences. Nous y avons trouvé d'utiles indications.

Dans le présent mémoire, nous relatons un certain nombre de faits d'ordre expérimental. L'histoire de diverses épidémies, qui ont sévi en 1897 et 1898 et qui sévissent encore soit en Europe, soit en Asie, sera rapportée en détail par le D[r] Réfik-Bey et le vétérinaire Réfik-Bey, chargés, par l'un de nous, de diriger l'application en grand du traitement sérothérapique.

Qu'il nous soit permis de remercier ici S. E. Sélim Pacha pour l'intérêt qu'il nous a témoigné depuis le début de nos recherches. Grâce à son intervention, nous sommes certains que la lutte contre la peste bovine, qui a déjà donné les meilleurs résultats, prendra de jour en jour une plus grande extension.

SYMPTOMES ET LÉSIONS DE LA PESTE BOVINE INOCULÉE

Lorsqu'on inocule un produit virulent, quel qu'il soit, par un mode quelconque, à un bovidé *de race sensible* — la dose pouvant être très faible — on observe constamment l'apparition d'une maladie cyclique, remarquablement semblable à elle-même, et rappelant de tout point les allures des fièvres éruptives.

Dans ces conditions expérimentales, on a donc l'impression d'un virus fixe qui tue à échéance déterminée. C'est là une ressource précieuse, puisque, connaissant la durée de l'incubation et l'évolution des symptômes, on se trouve à même de dépister les erreurs qui pourraient survenir au cours des recherches, et d'aborder, d'après un schème parfait, toutes les tentatives possibles de vaccination et de traitement.

La fièvre, premier signe de l'affection, apparaît du 4e au 6e jour, d'ordinaire le 5e. La température s'élève (en général brusquement) à 40°,5, 41° et même davantage. A ce moment l'animal semble encore absolument normal. Nous n'avons jamais noté d'incubations inférieures à 3 jours pleins, comme certains auteurs en signalent. On est en droit de se demander à ce propos si — dans certains cas au moins — les animaux inoculés n'avaient pas été déjà accidentellement contaminés. On sait en effet de quelles précautions minutieuses il faut s'entourer quand on veut éviter les infections accidentelles. Nous n'en avons observé, pour notre part, qu'au début de nos recherches, alors que notre installation était par trop sommaire; depuis, elles ont disparu complètement, grâce à une surveillance constante.

Le 6e ou le 7e jour, apparaissent l'inappétence et, le plus souvent, la constipation. Le 7e ou le 8e jour, l'inappétence augmente et les signes caractéristiques se manifestent. L'animal est triste, les poils se hérissent, les yeux larmoient, une salive abondante s'écoule de la bouche. Si l'on examine alors la muqueuse buccale, on constate, au collet des incisives, un liséré congestif, et, sur la face interne de la lèvre inférieure, de fines élevures, miliaires, blanchâtres.

Le 8e ou le 9e jour, l'état général s'aggrave. Les oreilles restent tombantes, l'animal est abattu, indifférent et réagit mal aux incitations extérieures. Il grince fréquemment des dents et tousse par moments. Les reins sont sensibles à la pression ; des tremblements musculaires se montrent au niveau des flancs et des muscles olécraniens. L'anorexie est désormais complète, même pour les boissons. Dans la bouche, les élevures sont devenues confluentes, l'épithélium qui les revêt se convertit par places en un détritus pultacé qui laisse, en s'éliminant, des érosions irrégulières à odeur fétide et à fond saignant, érosions

dont l'ensemble donne à la région malade un aspect à la fois rongé et macéré.

La conjonctive s'injecte ; les larmes, d'ordinaire mucopurulentes, coulent en abondance, agglutinant les poils du chanfrein. Un jetage, également mucopurulent, s'établit, déterminant des ébrouements. Enfin, la constipation fait place à une diarrhée intense, alimentaire, puis séreuse et souvent sanglante, d'une fétidité marquée.

Le 9e ou le 10e jour, la température, qui s'était maintenue autour de 41° sans rémissions notables, commence à s'abaisser au-dessous de 40°. L'animal reste couché ; la stupeur et la faiblesse sont extrêmes, l'aspect général tout à fait misérable. La diarrhée, profuse et incessante, épuise l'organisme. L'émaciation, jusqu'alors modérée, progresse maintenant à vue d'œil. On entend des gémissements fréquents. L'hypothermie s'accuse de plus en plus, et la mort arrive du 10e au 11e jour, rarement plus tard.

Jamais, dans la peste inoculée des races sensibles, nous n'avons observé de guérison. Toujours, au contraire, la maladie a revêtu la forme rapide et cyclique qui vient d'être esquissée. De nombreux passages n'ont rien changé à la symptomatologie.

Signalons, comme raretés, l'ictère, le melœna, les érosions de la face interne des joues, de la langue, du palais, du mufle et de la vulve. L'emphysème sous-cutané a constamment fait défaut.

A l'autopsie, on retrouve les lésions buccales dont nous avons parlé. La pituitaire est congestionnée, parfois semée de pétéchies. Dans la caillette, on constate de la congestion (le plus souvent accompagnée d'un piqueté hémorragique), des taches purpuriques, des érosions et des altérations des follicules clos. Les taches représentent l'origine habituelle des érosions : elles affectent la même forme irrégulière, et rien n'est plus fréquent que de rencontrer tous les termes intermédiaires entre une ecchymose et une perte de substance, parfois très profonde. C'est donc par ramollissement des pétéchies que se forment ces ulcères, tantôt linéaires (en coup d'ongle), tantôt polygonaux, jamais arrondis ou festonnés, si caractéristiques de la peste bovine. Leur étendue peut atteindre un centimètre carré et plus.

Leurs bords, taillés à pic, sont entourés d'une auréole hémorragique; leur fond, pultacé tant qu'il reste encore trace de la muqueuse, devient absolument sec lorsqu'il correspond à la couche musculaire. A côté de ces lésions ulcéreuses, on en trouve parfois d'autres qui succèdent à l'infiltration des follicules clos. Les organes lymphoïdes peuvent en effet se tuméfier, se ramollir et se transformer finalement en érosions arrondies ou ovalaires très profondes; le cas est assez rare. Les altérations de la caillette offrent toujours une confluence et une intensité particulière dans la zone pylorique.

L'intestin grêle est congestionné; on y voit souvent un granité hémorragique et même des taches pourprées, mais les ulcérations et les lésions des follicules sont peu communes. Dans le gros intestin, toutes ces altérations se rencontrent encore moins fréquemment.

La rate n'est *jamais* hypertrophiée.

Le foie, congestionné, revêt un aspect spécial, facile à reconnaître quand on l'a vu une fois, mais assez malaisé à décrire. La surface de section, débarrassée du sang qui la souille, apparaît lisse, violacée, avec un reflet vert jaunâtre. Elle est demi-transparente, et ce caractère, joint à l'existence du reflet brillant, évoque l'idée d'un moulage en cire. La vésicule biliaire est remplie d'un liquide abondant, le plus souvent jaune verdâtre, clair, à peine filant. Les reins sont congestionnés. Les poumons montrent un emphysème discret des lobes antérieurs.

Le sang, recueilli à l'autopsie, ou même dans le stade hypothermique, se coagule lentement et incomplètement.

Nous étudierons dans un autre travail les lésions histologi ques de la peste bovine inoculée.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

Sensibilité des diverses races. — Nous avons inoculé comparativement des bovidés appartenant aux espèces les plus communes en Turquie. Les races de Crimée, d'Odessa, d'Alep, d'Égypte, d'Anatolie (races noires) sont très sensibles; chez elles l'infection est *constamment* suivie de mort. La race grise de Roumélie (identique à celle, bien connue, des steppes) se montre, au contraire, moins réceptive, ou plutôt moins régulièrement

réceptive. A côté d'animaux qui succombent dans les délais ordinaires par inoculation, ou même par simple cohabitation avec des bovidés malades, on en trouve d'autres qui résistent ou présentent des formes curables. Nos observations sont donc parfaitement d'accord avec celles de Semmer et des autres auteurs. Les races mixtes (race grise et race de Crimée — race grise et race noire) sont parfaitement sensibles.

Il va sans dire que si les bovidés des steppes peuvent être

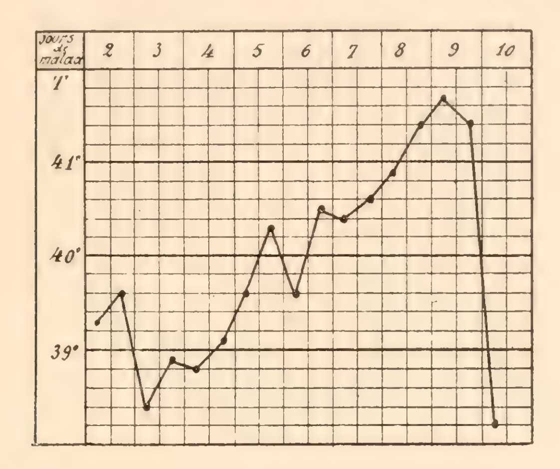


Fig. 1. — Race de Crimée, 3 ans. Injecté avec une goutte de sang sous la peau. Peste type, lésions types.

avantageux pour la préparation du sérum, ils sont absolument à rejeter dans toutes les expériences précises. Ce qui suivra — à moins d'une indication spéciale — se rapporte donc à l'inoculation d'animaux sensibles.

Nous n'avons pas encore fait des recherches sur les buffles, qui sont fréquemment atteints lors des épidémies.

Produits virulents. — Tout est virulent : humeurs, viscères, déjections ; c'est là une notion classique. Le sang infecte constamment les sujets sensibles à la dose d'une goutte. Dans un seul cas, nous avons inoculé un millième de centimètre cube ; l'animal a résisté, mais n'a point acquis l'état réfractaire. Dès le début de la fièvre, le sang contient le virus. Il le contenait encore le quinzième jour chez un bovidé gris en voie de guérison.

Si l'on filtre le sang, défibriné et étendu au dixième, sur le

filtre Chamberland ou sur la bougie Berkefeld, le liquide obtenu se montre inoffensif, mais il ne vaccine pas. L'humeur aqueuse, la sérosité céphalo-rachidienne se comportent de même.

Modes divers d'inoculation. — On infecte aisément les animaux par les divers modes : inoculation sous-cutanée; intraveineuse, intrapéritonéale, intratrachéale, ...badigeonnage

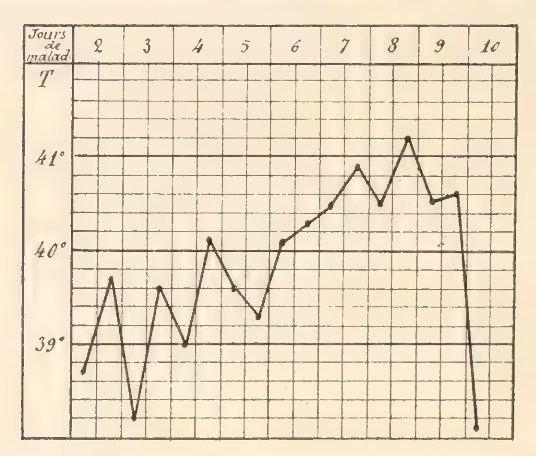


Fig. 2. — Race de Crimée, 2 ans. Injecté avec 4 litres de sang, en 6 points sous la peau. Signes classiques, lésions classiques.

des muqueuses avec le sang ou les déjections; cohabitation.

Quelles que soient la voie choisie et la matière inoculée, le résultat ne varie point. L'injection d'une trace de virus à l'extrémité de la queue tue dans les délais habituels. Des passages, déjà nombreux, ne se sont encore traduits par rien de saillant.

Influence des doses. — Lorsqu'on dépasse, par injection dans le tissu cellulaire, la dose sûrement mortelle, on ne change rien ni à la durée ni aux caractères de l'affection expérimentale. L'inoculation de dix, cent, mille, quatre mille centimètres cubes de sang donne identiquement les mêmes résultats que l'inoculation d'une goutte. Il suffira, pour s'en convaincre, de comparer les deux courbes suivantes (fig. 1 et 2).

Résistance du virus. — Le sang, défibriné ou non, et conservé dans une pipette sous un faible volume, perd rapidement son activité. Il est devenu inoffensif après six à sept jours à la glacière, après trois à quatre jours à la température de l'été. Le sang, défibriné ou citraté (à 3 pour mille), sous le volume de

200 c. c. demeure virulent pendant 12 jours au moins à 15°-18°.

Si l'on incorpore 1 c. c. de sang défibriné à 5 c. c. de gélatine, et si l'on met à la glacière, le mélange est encore infectieux après 32 jours à la dose de 2 c. c.; il est inactif après 60 jours

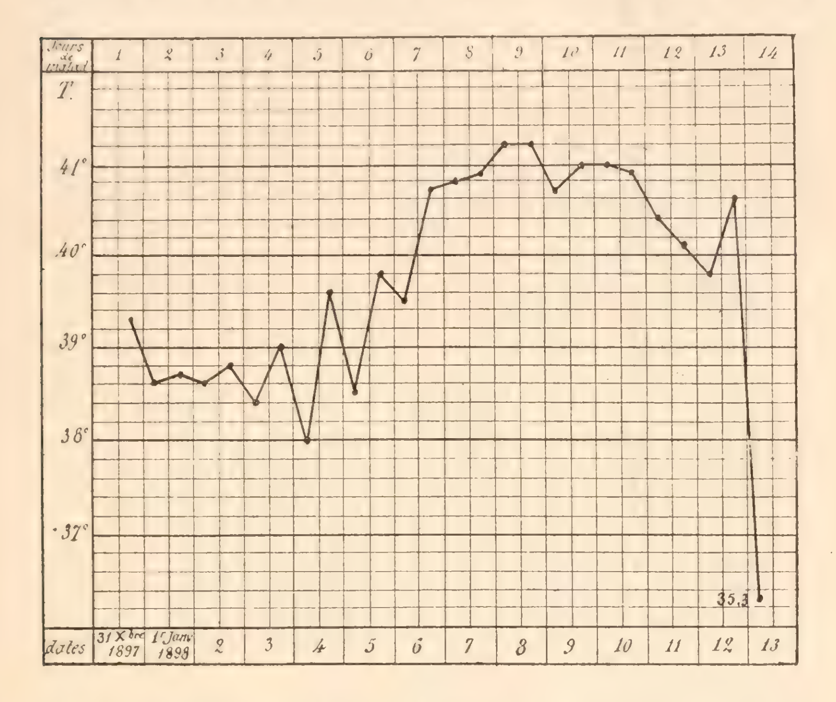


Fig. 3. — Chèvre race de Malte, 32 kil. — Inoculée, sous la peau, avec 0,25 c. c. de sang virulent. — Le 8e jour, abattement, anorexie. — Le 11e jour, diarrhée fétide, état comateux. — Le 14e jour, mort dans l'algidité. — Congestion de l'intestin, foie *en cire*, vésicule biliaire distendue, bile jaune clair, liquide. Rate normale.

(même dose). Le sang, réparti dans la gélatine, et placé à l'étuve, cesse d'être virulent après 4 à 6 jours.

Les sels de quinine paraissent sans action sur le virus.

Inoculations aux animaux de laboratoire. — Le pigeon, le lapin, le cobaye sont absolument réfractaires. L'injection de phloridzine ne permet pas de vaincre l'immunité du cobaye. Si l'on inocule 5 c. c. de sang virulent dans le péritoine d'un lapin ou d'un pigeon, le sang de ces animaux, prélevé le cinquième jour et injecté aux bovidés (à la dose de 5 c. c.), ne leur donne ni la peste ni l'immunité.

Inoculations au mouton. — En employant divers modes ou artifices d'inoculation, en faisant usage de doses *énormes*, on détermine simplement (et encore pas toujours) une élévation thermique sans phénomènes généraux. Si l'on injecte sous la peau d'un mouton 50 c. c. de virus, et si, le cinquième jour, on inocule 5 c. c. du sang de ce mouton à un veau, celui-ci peut mourir dans les délais ordinaires ou avec un retard (par exemple en 24 jours); il peut aussi contracter une affection curable. Le passage par le mouton n'augmente donc pas la virulence, au moins dans les conditions où nous avons expérimenté. Les animaux qui nous ont servi appartenaient à la race asiatique et à la race à grosse queue.

Inoculation à la chèvre. — La chèvre est certainement sensible; du moins succombe-t-elle dans la majorité des cas. Les symptômes observés sont la fièvre et l'émaciation progressive. La mort survient en 9 à 60 jours. Les femelles pleines avortent constamment. Une seule fois nous avons noté de la diarrhée, coïncidant avec la courbe thermique typique (fig. 3).

Nous sommes convaincus qu'avec certaines races, et aussi avec certains virus, on pourra réaliser sûrement l'infection classique.

Le sang des chèvres inoculées a donné au veau une affection tantôt mortelle, tantôt curable ; il a parfois donné de la fièvre à d'autres chèvres.

Nous avons expérimenté sur la race d'Anatolie et sur celle de Malte.

PESTE BOVINE ET FIÈVRE DU TEXAS

Dans un travail spécial, nous étudierons la fièvre du Texas (mieux nommée, par Celli et Santori, « malaria des bovidés »), affection très répandue en Turquie, mais d'ordinaire latente. A cet égard il convient de séparer nettement les animaux *importés* des animaux *indigènes*. Les premiers sont parfois atteints de malaria type, sous forme sporadique ou épidémique. La maladie n'est pas fréquente, et, le plus souvent, on la confond avec la fièvre charbonneuse qu'elle simule assez bien pour l'observateur non prévenu (urines rouges; mort subite, ou presque, dans certains cas; rate grosse; sang fluide et noir). Les seconds ne

montrent les signes caractéristiques de la fièvre du Texas que lorsqu'ils sont atteints de peste bovine. C'est donc uniquement au cours des épidémies de typhus contagieux ou dans les expériences de laboratoire qu'on peut constater la malaria des sujets indigènes.

Malgré de nombreux examens microscopiques, nous n'avons jamais pu rencontrer l'agent pathogène — le *pirosoma bigem-*

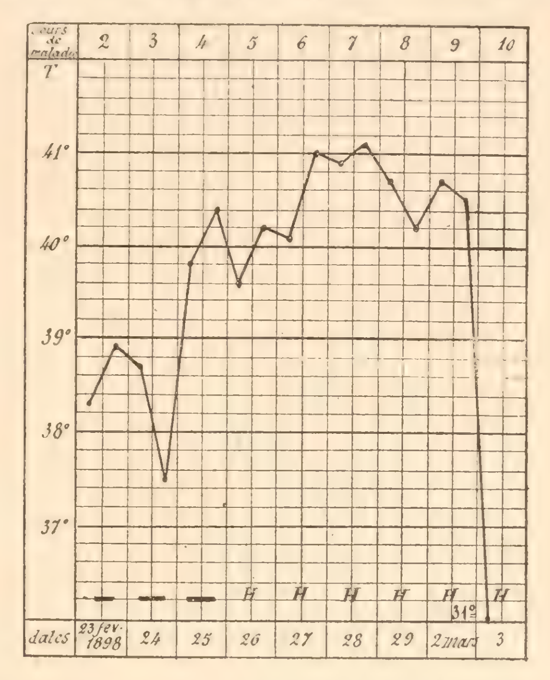


Fig. 4. — Race de Crimée, 1 an. — Inoculé dans les veines avec 1/10 c. c. de virus mixte. — Peste bovine classique. — Ni symptomes ni lésions de malaria. — Hématozoaires pendant la vie (H); après la mort, dans le sang et les viscères.

mum — dans le sang des animaux sains ou paraissant tels. Au contraire, ce parasite se manifeste avec une excessive fréquence après inoculation de virus mixte ou de virus pur.

Inoculation de virus mixte. — Nous appelons virus mixte tout sang pesteux qui contient des hématozoaires. Peu importe que l'animal dont il provient ait eu ou non des symptômes malariques.

Lorsqu'on inocule ce virus, on transmet à la fois la peste bovine et le pirosoma. Mais, tandis que la peste se révéle par tous ses signes, l'hématozoaire ne produit ordinairement aucun

trouble appréciable. On le rencontre dans le sang, à partir du quatrième jour au plus tôt, et voilà tout. (Voir la courbe de la fig. 4.)

De temps en temps cependant, l'organisme malarique traduit son existence par une fluidité spéciale du sang, qui noircit rapidement après la mort. Enfin, chez trois animaux, nous avons vu les manifestations bien connues de la fièvre du Texas — hémoglobinurie, anémie suraiguë, dyspnée intense — compliquer la peste bovine. A l'autopsie, la rate était hypertrophiée, le foie granuleux et d'un jaune plus ou moins vif, lésions qui tranchaient par leur caractère insolite sur les altérations concomitantes du typhus contagieux.

Quand on inocule le virus mixte à des bovidés gris, ceux-ci peuvent résister à la peste et montrer simplement des hématozoaires pendant 3 à 12 jours. Leur sang, inoffensif pour un animal indigène, peut donner une maladie grave, parfois mortelle, à un sujet importé. Nous avons fait l'expérience sur des bovidés de même race (Crimée); les uns nés en Turquie se montrèrent quasi-réfractaires, les autres venus de Russie, très réceptifs. Notre observation confirme donc pleinement celle de tous les auteurs qui ont écrit sur la fièvre du Texas.

Un veau de Crimée, qui avait reçu du sang malarique, présenta une fébricule bénigne et des parasites du huitième au seizième jour. Inoculé, trois mois après, avec du virus pesteux pur, il succomba au typhus contagieux en présentant des hématozoaires. Ceux-ci s'étaient donc conservés à l'état latent dans son organisme. Voilà un fait qui explique aisément ceux qui vont suivre.

Inoculation du virus pesteux pur. — Nous appelons ainsi : l'infection par le sang dépourvu de pirosoma, par l'humeur aqueuse ou le liquide céphalorachidien des sujets morts de peste avec ou sans hématozoaires ; par le sang des chèvres et moutons qui ont reçu du sang pesteux pur ou non ; enfin, par cohabitation.

Dans ces diverses conditions expérimentales, il arrive très souvent qu'on voit apparaître le pirosoma en même temps que les signes du typhus. D'ordinaire, aucun symptôme malarique ne se produit ; parfois le sang devient fluide et noir comme il a été dit plus haut ; dans deux cas les manifestations de la fièvre du Texas associée furent des plus marquées.

Quand on inocule le virus pur à des animaux des steppes, ils

peuvent résister à la peste bovine et montrer des hématozoaires transmissibles par inoculation. Ce résultat, paradoxal en apparence, et qui surprend fort au début des recherches, prouve (mieux encore que les autres expériences relatées dans ce chapitre) que le virus pesteux joue vis-à-vis du virus malarique le rôle d'un véritable agent révélateur. D'autres affections possèdent-elles ce singulier pouvoir? Nous l'ignorons absolument.

Comme conclusion *pratique*, nous dirons qu'il est impossible ici de se procurer à coup sûr du virus pesteux pur, quelles que soient les précautions dont on s'entoure. Tant d'animaux recèlent des hématozoaires latents, que le pirosoma se rencontre incessamment au cours des expériences. Nous avons dû, par conséquent, nous servir souvent du virus mixte pour immuniser et hyperimmuniser les bovidés. Il n'en est résulté d'ailleurs aucun inconvénient. Certains animaux ont parfaitement supporté des doses *énormes* de sang malarique, mais — soit dit en passant — leur sérum n'a acquis *aucun pouvoir préventif* (et encore moins curatif) vis-à-vis de l'hématozoaire.

IMMUNITÉ CONTRE LA PESTE BOVINE

Immunité en général. — Les animaux guéris de la maladie naturelle possèdent, comme on le sait, une immunité solide et durable. C'est là un fait que nous avons constaté à maintes reprises.

Expérimentalement, bien des moyens ont été proposés pour créer l'état réfractaire. Les deux principaux consistent dans la vaccination par la bile et la sérothérapie.

La bile confère une résistance parfaite, mais assez peu durable. A cet égard nos recherches sont d'accord avec les faits déjà connus. Il est certain qu'avant l'emploi du sérum, la méthode de M. Koch constituait une précieuse ressource. Aujourd'hui on ne saurait y avoir recours qu'en l'absence d'autres moyens.

Il en est de même des procédés préventifs et curatifs qui utilisent le sérum des animaux *guéris*.

Aujourd'hui on fait appel exclusivement au sérum des animaux hyperimmunisés. C'est dans cet ordre d'idées qu'ont été entreprises les recherches, si intéressantes, de MM. Kolle et Turner.

Dès le début de nos expériences, nous savions déjà qu'en matière d'infection les *fortes doses* ne produisent pas plus d'effet que les doses minimes. Aussi avions-nous commencé à tirer parti de cette curieuse donnée pour l'hyperimmunisation des animaux. Le premier travail de MM. Kolle et Turner, qui indiquaient (sans grands détails du reste) qu'on peut injecter *progressivement* jusqu'à 4 litres de virus aux bovidés guéris, nous confirma dans notre manière de voir et nous encouragea à aller plus loin encore. Depuis ce moment nous avons fait un usage systématique des fortes doses, non pas progressivement, mais *brutalement*, et nous nous en sommes très bien trouvés.

C'est qu'en effet l'immunité des animaux guéris se montre pour ainsi dire *illimitée*. A peine sortis de la période fébrile, ils peuvent recevoir coup sur coup 4, 8, 10 litres de sang virulent; *jamais* on n'arrive à les tuer, quelle que soit leur race, quel que soit leur âge. Sur ce point notre pratique, déjà assez grande, nous permet d'être absolument affirmatifs (tout au moins pour ce qui concerne les bovidés de l'Empire ottoman et les virus que nous avons eus entre les mains).

Pouvoir préventif du sérum. — Ce pouvoir est facile à mettre en évidence, soit qu'on injecte le sérum puis le virus, soit qu'on emploie la méthode dite simultanée, soit enfin que l'intervention thérapeutique ait lieu pendant l'incubation.

1° *Sérum puis virus.* — Expérimentalement, le sérum des animaux qui ont reçu 4 litres de sang pesteux s'est toujours montré préventif à la dose de 25 c. c. contre l'inoculation virulente pratiquée plusieurs jours après.

Lors des épidémies, les bovidés auxquels nous avons injecté la même dose de sérum ont été parfaitement protégés; pendant plusieurs semaines on a pu les soumettre impunément à divers modes d'infection.

Pour des raisons *toutes spéciales*, nous nous sommes contentés jusqu'ici du sérum comme unique moyen de vaccination en grand. Les résultats n'ont rien laissé à désirer, ainsi qu'on pourra en juger lorsque paraîtront les statistiques détaillées.

Mais nous savons fort bien que l'immunité passive s'évanouit après quelques mois. Aussi comptons-nous mettre en œuvre, au moment opportun, des méthodes susceptibles de créer un état réfractaire plus durable, par exemple le procédé simultané ou

d'autres, actuellement à l'étude. Nous pensons toutefois que, dans nombre de cas, il faudra continuer à employer le sérum seul, quitte à forcer les doses, ou même à réitérer les injections.

2° *Méthode simultanée.* — Sous ce nom, MM. Kolle et Turner ont préconisé un procédé qui consiste à injecter d'un côté de l'animal 0cc,5 à 1 c. c. de virus, et de l'autre une quantité de sérum variant selon la force de celui-ci. Le but qu'on se propose n'est point de supprimer l'infection, mais, bien au contraire, de produire une maladie légère caractérisée par de la fièvre et quelques phénomènes généraux sans gravité. Il faut donc faire usage d'un sérum d'activité connue, et injecter une dose soigneusement déterminée. Sinon il arrive, ou bien que l'animal ne montre aucune réaction — alors son immunité sera transitoire,

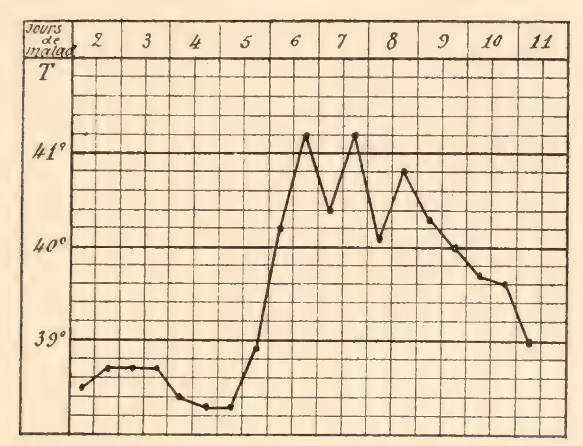


Fig. 5. — Race de Crimée, 3 ans. Inoculé d'un côté du corps avec 1 c. c. de sang virulent, de l'autre avec 25 c. c. de sérum. Fièvre seule.

— ou bien qu'il prend la peste bovine type — circonstance défavorable, malgré les chances de guérison par la sérothérapie.

Nous avons répété très souvent l'expérience de MM. Kolle et Turner. Le sérum des bovidés qui ont reçu 4 litres de virus s'est montré, ici encore, actif à la dose de 25 c. c. Quelle que fût la race, quel que fût l'âge de l'animal, les signes classiques de la peste bovine n'ont jamais paru. Les sujets appartenant aux races sensibles ont présenté le plus souvent de la fièvre. (Voir la courbe (fig. 5). Lorsque celle-ci a fait défaut, les animaux ont pu néanmoins supporter, quelques jours après l'inoculatio

simultanée, des doses énormes de virus. Les bovidés des steppes ne réagissent point d'ordinaire; ils deviennent cependant insensibles aux infections massives.

Si le virus, inoculé en même temps que le sérum, contient des hématozoaires, on constate la présence de ceux-ci à partir du 4e jour (au plus tôt) et pendant quelques jours. Il n'occasionne aucun trouble. Les signes caractéristiques de la fièvre du

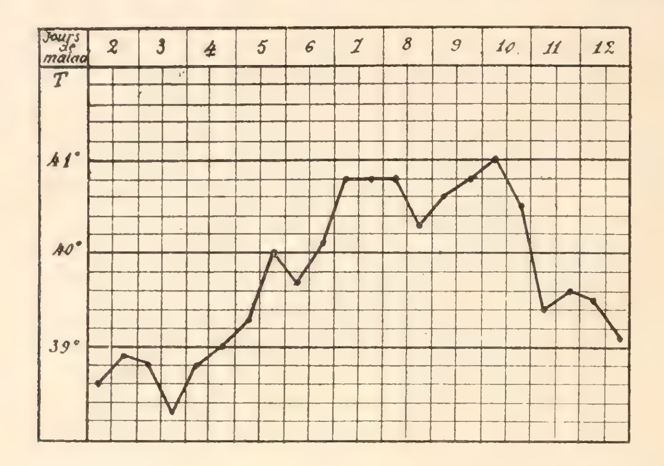


Fig. 6. — Race de Crimée. Inoculé sous la peau avec 1 c. c. de sang virulent. Reçoit le 4e jour 50 c. c. de sérum. Fièvre seule. Le 17e jour on injecte, impunément, 3,500 c. c. de virus. Le 19e 3,200, en tout 6 litres 7. Un témoin, inoculé le même jour avec 1 c. c. du même sang, est mort en 10 jours.

Texas ne se manifestent que dans les cas où la dose de sérum n'a pas été suffisante. Ils apparaissent alors comme complication d'une peste bovine type. Le fait est rare, d'ailleurs.

Il est néanmoins indiqué, dans un pays comme le nôtre, d'éviter l'emploi du virus mixte pour la méthode simultanée. On peut tourner la difficulté en se servant du sang de mouton infecté, ainsi que le recommandent MM. Kolle et Turner; on peut la tourner bien plus simplement encore, comme nous le montrerons ultérieurement.

3° *Virus puis sérum*. — Expérimentalement, le sérum, injecté avant l'apparition de la fièvre, se montre parfaitement actif; mais il faut élever la dose à 50 c. c., au moins à partir du troisième jour. L'affection se trouve alors réduite à une fièvre sans gravité. (Voir la courbe de la fig. 6.)

De même, lors des épidémies, on réussit aisément à sauver les animaux en état d'incubation.

Pouvoir curatif du sérum. — Pour guérir les sujets déjà malades, on doit injecter une quantité plus forte encore de sérum (au moins 100 c. c.). Les chances de réussite décroissent évidemment à mesure qu'on s'éloigne du début de la période fébrile. Elles sont nulles alors que la température commence à baisser, presque nulles quand la diarrhée est devenue abondante.

Non seulement dans le laboratoire (voir la courbe de la fig. 7), mais surtout au cours de diverses épidémies, nous avons eu l'occasion de traiter un certain nombre d'animaux malades. Le chiffre des guérisons a été très élevé ; les observations seront publiées prochainement.

Comme les savants du Cap, nous avons constaté que l'injection *unique* d'une *forte dose* est bien préférable à la répétition de doses faibles ou même moyennes. Nous avons constaté de plus la supériorité de la voie intraveineuse sur la voie sous-cutanée. Enfin, nous considérons comme *indispensable* d'entourer des plus grands soins les animaux traités. Il faut les soustraire à l'influence du froid, les alimenter avec des barbotages, du thé de foin, au besoin même du lait. Le plus souvent on sera obligé d'introduire les liquides dans le fond de la bouche.

Les sujets, dont la peste bovine se complique de malaria, résistent à tout traitement (même si l'on emploie des doses *énormes* de sérum *mixte*) ; les sujets tuberculeux ne guérissent, sans doute, jamais. Dans le seul cas où nous avons sauvé un animal tuberculeux, celui-ci a succombé pendant la convalescence ; il est vrai que les lésions bacillaires étaient exceptionnellement développées.

Sérum et virus mélangés. — Nous n'avons fait que peu de recherches sur ce point ; elles n'ont pas encore donné de résultats satisfaisants au point de vue de la vaccination. MM. Kolle et Turner sont d'ailleurs arrivés à une conclusion analogue, à la suite d'expériences bien plus nombreuses que les nôtres.

Préparation du sérum. — Nous la considérons comme *extrêmement facile*. Sur une quarantaine d'animaux que nous avons hyperimmunisés, pas un n'a succombé, pas un n'a même présenté d'altérations sérieuses de la santé.

Pour obtenir le sérum, on peut s'adresser à des bovidés

guéris de la maladie naturelle ou immunisés par n'importe quel moyen. Quel que soit leur âge, quelle que soit leur race, il suffit de leur injecter en une fois, ou coup sur coup — selon la quantité de virus dont on dispose — 4 à 8 litres de sang pesteux.

Il est bien plus simple encore de pratiquer l'immunisation et l'hyperimmunisation en une seule séance. On injecte alors

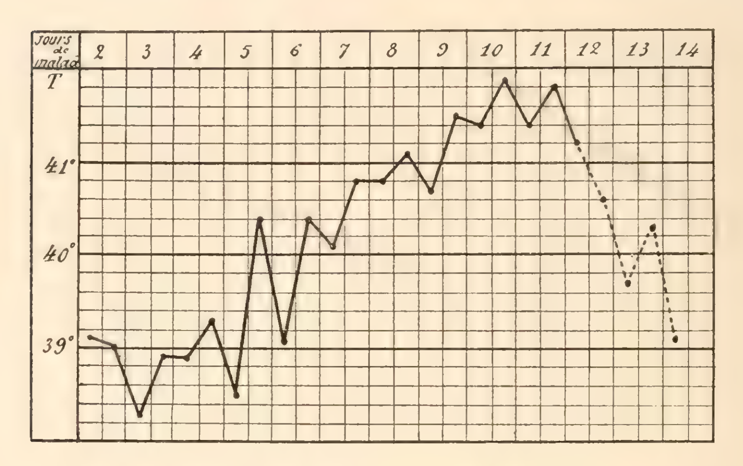


Fig. 7. — Race de Crimée, 3 ans. Inoculé, sous la peau, avec 1 c. c. de sang virulent. Le 12e jour état très grave (anorexie, coryza, conjonctivite, stomatite, diarrhée). On injecte, le matin, 100 c. c. de sérum sous la peau. Le lendemain l'animal commence à manger. Peu de jours après la guérison est complète. Le 18e jour on inocule, impunément, 4 litres de virus.
Un témoin, de *race grise*, inoculé le même jour, avec le même virus, est mort dans les délais normaux.

4 litres de virus et 25 c. c. de sérum ; 15 jours après, le sang de l'animal est devenu préventif à la dose de 25 c. c. Au lieu de 4 litres on peut en inoculer 8 ; le sang sera alors plus actif ; mais l'activité ne paraît pas croître en proportion de la dose de virus inoculée. Le procédé rapide qui vient d'être indiqué réussit admirablement avec la race grise : il semble réussir également quand on s'adresse à des animaux adultes des races sensibles, mais nos observations sont encore peu nombreuses pour ces derniers.

Quinze jours après l'injection virulente massive (ou après la dernière injection, si l'on a opéré en plusieurs séances) on saigne l'animal. Pendant 4 à 5 semaines, on continue à prendre du sang tous les 5 à 6 jours ; cela fait 6 saignées. Le sérum de la sixième

saignée ne diffère pas comme activité de celui de la première.

Tous les sérums des animaux qui ont reçu 4 litres de virus paraissent absolument de même force ; jamais nous n'avons constaté de différence appréciable. Toutefois, il est plus prudent de les mélanger et de les titrer exactement. Ce titrage peut se faire de diverses façons ; l'inoculation simultanée, préconisée par MM. Kolle et Turner, nous paraît la meilleure.

Après la sixième saignée, on injecte à nouveau 4 litres (ou plus) et l'on saigne au bout de 15 jours. Et ainsi de suite[1]. Le sérum devient plus actif à mesure que l'animal est depuis plus longtemps soumis aux inoculations. Bien que certains du fait, nous ne pouvons donner de chiffres exacts à cet égard, parce que la plupart des animaux que nous possédions au début de nos recherches, et qui étaient de trop petite taille, ont été remplacés progressivement par des sujets plus volumineux.

Le sérum, additionné d'1/4 0/0 d'acide phénique, se conserve parfaitement sans perdre ses propriétés thérapeutiques.

Il nous reste à dire quelques mots de la récolte du virus qui sert à l'immunisation. Après avoir infecté les animaux, on recueille leur sang au moment où commence l'hypothermie, c'est-à-dire le 9e ou le 10e jour (en général le 9e). Le virus, ainsi obtenu, ne contient pas d'impuretés ; aussi peut-il être injecté à doses massives sans jamais produire d'abcès.

La saignée (à blanc) se pratique dans la carotide ; on reçoit le sang dans un bocal contenant une solution concentrée de citrate de potasse. Cette solution est calculée de telle façon que la proportion du sel anticoagulant atteigne 3 0/00. Le sang citraté remplace avantageusement le sang défibriné ; nous avons constaté qu'il donne exactement les mêmes résultats au point de vue de l'hyperimmunisation.

Nous rejetons absolument le sang des animaux qui ont présenté des signes de fièvre de Texas ; mais nous sommes obligés d'employer souvent du virus qui contient le pirosoma. Bien que nous n'ayons jamais eu d'accidents, nous préférerions utiliser systématiquement comme virus le plasma du sang citraté. Lorsque nous posséderons les instruments nécessaires au centri-

1. A chaque série d'inoculations, les animaux réagissent par une élévation thermique sans gravité dont la durée, parfois très courte, ne dépasse jamais une dizaine de jours.

fugage en grand, nous pratiquerons donc toutes les inoculations avec le plasma. L'expérience nous a déjà montré qu'on hyperimmunise parfaitement les animaux de cette façon.

Inutile de dire que l'injection du sang pesteux doit se faire aseptiquement; la majorité des animaux résorbent ce sang en deux à trois jours; quelques-uns (toujours les mêmes) peuvent présenter, pendant une semaine au plus, une ou deux collections fluctuantes. Celles-ci contiennent un sang liquide, exempt d'impuretés, également incapable d'infecter et de vacciner les animaux.

Nichan Tach, janvier 1899.

PREMIÈRE NOTE SUR LA MALARIA DES BOVIDÉS

PAR MM.

M. NICOLLE
Directeur de l'Institut Impérial de bactériologie de Constantinople.

ADIL-BEY
Chef de laboratoire.

Sous les noms d'hémoglobinurie du bœuf (Babes); de fièvre du Texas (Smith et Kilborne-Weisser et Maassen); d'hématinurie de Sardaigne (Sanfelice et Loi): d'hémoglobinurie de Finlande (Krogius et v. Hellens); de malaria des bovidés (Celli et Santori), etc., on désigne une seule et même affection, produite par le *Pirosoma bigemmum*, parasite du groupe des hématozoaires. Observée à l'heure actuelle dans de nombreux pays, elle a fait l'objet de recherches réitérées, et les expériences récentes de M. Koch viennent de montrer quel intérêt s'attache à ce paludisme bovin, si voisin de la malaria humaine.

La plupart des auteurs admettent une forme aiguë et une forme lente. La première se traduit par de la fièvre, une anémie rapide, et, fréquemment aussi, par de l'hémoglobinurie. La durée est de 5 à 6 jours, parfois moins dans les cas pernicieux. La mortalité peut dépasser 50 0/0. A l'autopsie, on trouve la rate hypertrophiée, le foie congestionné, la bile abondante et épaisse. Les hémorragies des reins et des parois intestinales ne sont pas rares. La forme lente revêt l'aspect d'une fébricule plus ou moins prolongée, à allures bénignes. Elle peut même rester absolument latente ; le diagnostic n'est alors possible que par l'examen du sang. Certains observateurs pensent que la malaria confère l'immunité, d'autres admettent des rechutes fréquentes. Dans beaucoup de pays, les animaux indigènes jouissent d'une immunité presque absolue: partout, les jeunes sujets se montrent très résistants. C'est précisément cette résistance des jeunes qui expliquerait l'état quasi-réfractaire des adultes, par suite d'une véritable vaccination.

La malaria règne surtout dans les contrées marécageuses;

on s'accorde, depuis les travaux de Smith et de Koch, à faire jouer aux insectes (tiques) un rôle presque exclusif dans la contagion.

L'affection n'est inoculable qu'aux bovidés. Si certains auteurs n'ont pu réaliser l'infection expérimentale, c'est sans doute parce qu'ils se sont adressés soit à des animaux indigènes, soit à des jeunes sujets, souvent aux deux.

Les divers savants qui ont étudié la peste bovine dans l'Afrique australe ont signalé comme fréquente la présence du Pirosoma dans le sang des animaux atteints du typhus contagieux naturel ou expérimental.

Nous avons fait, en Turquie, pareille constatation. *Lors des épidémies* de peste bovine, on rencontre très souvent le Pirosoma chez les animaux malades. Parfois il se traduit par des signes plus ou moins caractéristiques; mais, dans la majorité des cas, il reste latent. Ces faits seront mentionnés en détail dans un prochain mémoire du Dr Réfik Bey et du vétérinaire Réfik Bey.

Les rapports du Pirosoma et du virus pesteux, *au point de vue expérimental*, ont été déjà indiqués par nous (voir plus haut p. 326); inutile d'y revenir. Nous décrirons aujourd'hui l'histoire d'une petite épizootie de malaria bovine, observée à la fin de l'année 1898, en y joignant le résultat de quelques recherches de laboratoire concernant l'infection et l'immunisation malariques. Une note ultérieure sera consacrée à l'hématozoaire et aux lésions qu'il détermine.

*
* *

L'épizootie en question a sévi à Kutchuk-Tchiftlik (Constantinople) sur des vaches laitières *importées* de Crimée [1]. 50 animaux sur 120 ont été atteints: 16 sont morts. Les sujets qui ont succombé étaient, pour un tiers, des vaches pleines; pour le reste, des bêtes le plus souvent âgées, tuberculeuses ou porteuses de lésions échinococciques étendues (foie et poumons). Les jeunes animaux ont été tous épargnés.

La maladie a revêtu trois formes : foudroyante, aiguë et légère: les deux premières constamment mortelles, la troisième toujours bénigne.

1. Nous avons montré, dans notre précédent travail sur la peste bovine, que, malgré la fréquence du Pirosoma chez les bovidés *indigènes*, ceux-ci semblent ne jamais être atteints de malaria à signes cliniques manifestes.

Forme foudroyante (4 cas). — Elle apparaît, comme son nom l'indique, sans aucun signe précurseur. L'animal, après quelques instants d'inquiétude, vacille, tombe, s'agite un peu et meurt. A l'autopsie, on trouve un hémopéritoine, des ecchymoses épiploïques et mésentériques, et une rupture de la rate.

Forme aiguë (12 cas). — Elle débute par de la fièvre (40°,5-41°,5), de l'inappétence, de la tristesse. La rumination est irrégulière et la sécrétion lactée diminue considérablement. Puis l'appétit disparaît; la station debout devient difficile, par suite d'un affaiblissement portant principalement sur les membres antérieurs; les muqueuses se décolorent.

La sécrétion du lait cesse; l'abattement augmente; on constate en général de la constipation, rarement un peu de ramollissement des matières fécales. Le poil est terne et piqué.

Les forces déclinent de plus en plus; la respiration devient brève et rapide; de la bouche s'écoule une salive abondante. Enfin, l'animal meurt dans le coma. Pendant les dernières heures, la température s'abaisse fortement.

C'est, en somme, l'image d'une anémie rapide et profonde. Chez deux animaux, nous avons vu l'affection se terminer par la mort subite (rupture de la rate).

La forme aiguë dure de 2 à 4 jours; dans les deux tiers des cas, elle s'accompagne d'une hémoglobinurie d'intensité variable; les urines sont tantôt rouge franc ou rouge brun, tantôt saumonnées (lavure de chair). L'hémoglobinurie constitue parfois le premier signe de la malaria; d'ordinaire elle n'apparaît que le deuxième ou le troisième jour.

Les lésions de la forme aiguë peuvent se résumer ainsi : cadavre peu émacié; rate grosse, molle, diffluente; reins congestionnés; sang fluide, très pauvre en hématies, souvent clair, et même rosé; bile abondante et épaisse.

Le foie offre deux aspects différents (sans rapports visibles avec les signes observés); tantôt il est rouge brun, uniforme; tantôt il apparaît granuleux et jaune doré. Dans ce dernier cas, en examinant attentivement une section nette de l'organe, on trouve les lobules jaunes, à centre portal (intervertis) et limités par des lignes d'un gris rosé qui correspondent aux veines et zones sushépatiques. Cette lésion est absolument caractéris-

tique; quand on immerge des fragments dans le sublimé de Mayer, ils prennent une teinte vert-bronze.

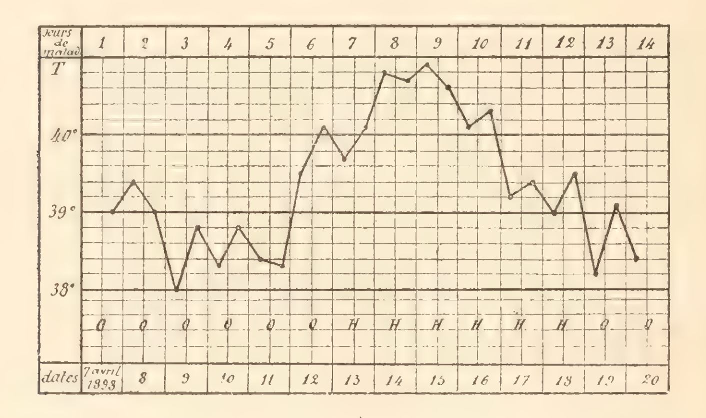
Le tube digestif, les poumons, etc., sont sains. Dans les deux cas où l'affection s'était terminée par la mort subite, nous avons rencontré l'hémopéritoine et la rupture splénique.

Forme légère (34 cas). — Elle se traduit par de la fièvre, un peu de faiblesse, une émaciation modérée, de l'inappétence, de la diminution de la sécrétion lactée. Jamais on n'observe d'hémoglobinurie. La guérison survient rapidement.

Inutile de dire que l'hématozoaire s'est montré constant, quelle que fût la forme. A l'autopsie, on le trouvait dans le sang et les viscères. Le sang d'un fœtus de six mois ne renfermait aucun parasite.

* * *

En inoculant le virus malarique aux animaux *importés*, on reproduit aisément l'affection naturelle. Par contre, cette même inoculation ne détermine chez les bovidés *indigènes* qu'une fièvre



— Fig. 1. B. A. 8. Race de Crimée. — Inoculé dans les veines avec 0,01 c. c. du sang de B A 7 (voir plus bas) pris le 12e jour. Fièvre seule. H, hématozoaires dans le sang. O, pas d'hématozoaires.

sans gravité. Il est curieux de comparer, à cet égard, la sensibilité des animaux de Crimée importés à la résistance des animaux de Crimée indigènes. C'est là un parallèle que nous avons eu souvent l'occasion de faire.

L'injection de sang malarique aux diverses races du pays

détermine presque toujours un mouvement fébrile et l'apparition du Pirosoma dans le sang. Nous avons vu, rarement il est vrai, des sujets jeunes résister complètement à l'infection hématozoïque expérimentale. La fièvre, sans caractère spécial, commence du cinquième au huitième jour et dure de 2 à 6 jours ; la température peut atteindre 41°,5. Le Pirosoma se montre du quatrième au huitième jour et disparaît du huitième au seizième ; on le trouve presque quotidiennement dans le sang.

Voici deux exemples d'infection chez des animaux de Crimée autochtones (fig. 1 et 2).

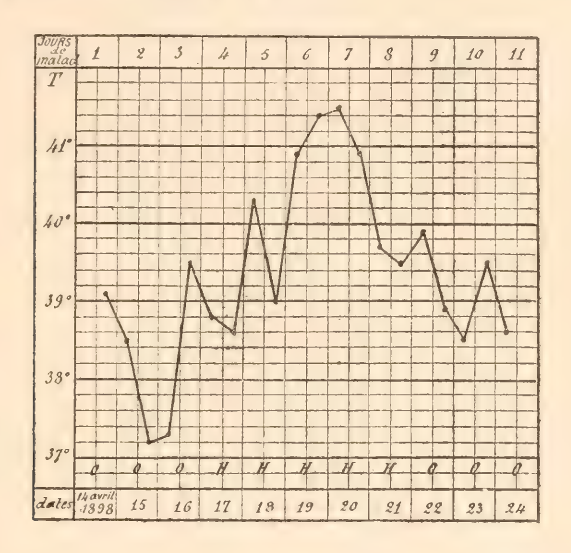


Fig. 2. B. A. 9. Race de Crimée, 1 an. Inoculé sous la peau avec 1 c. c. de sang de B. A. 8 pris le 8e jour. Fièvre seule.

On voit qu'il est aisé de faire des passages, soit dans les veines, soit sous la peau, même en employant de très faibles quantités de sang virulent.

La malaria confère-t-elle l'immunité ? Pour les animaux importés, nous l'ignorons, n'ayant pas fait d'expériences à ce sujet [1]. Pour les bovidés indigènes, il s'agit plutôt, croyons-nous, d'une *tolérance* que d'une immunité véritable. Voici les raisons qui militent en faveur de cette manière de voir. Tout d'abord c'est la

1. Mais il n'y a aucune raison d'admettre qu'ils se comportent autrement que les animaux nés en Turquie.

fréquence du Pirosoma dans la peste bovine naturelle ou expérimentale (inoculation de virus pesteux pur), fréquence qui ne saurait s'expliquer qu'en admettant que nombre d'animaux renferment le Pirosoma à l'état latent.

Le parasite existe donc chez des bovidés, sains d'apparence.

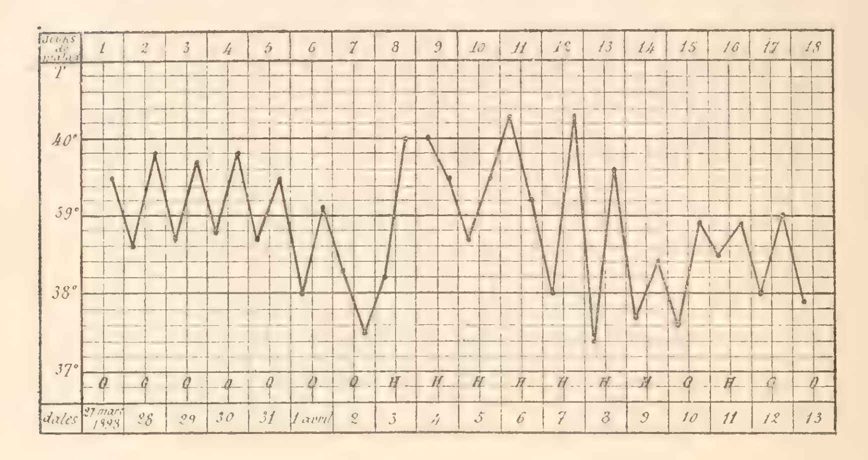


Fig. 3. B. A. 7. Première inoculation.

qui le tolèrent mais ne le détruisent pas. Il y a plus. Si l'on réfléchit, d'une part, à la fréquence du Pirosoma latent, d'autre part, à ce fait que le virus malarique inoculé amène presque toujours [1] l'apparition de l'hématozoaire, il est difficile d'admettre que les bovidés ne sont pas réinfectables.

Voici un exemple, — auquel nous avons fait allusion dans un précédent travail, — de persistance de l'hématozoaire à l'état latent. Un animal de Crimée, âgé de un an et demi, est inoculé le 27 mars 1898, dans les veines, avec 1/10 de c. m. c. de sang malarique. Il présente de la fièvre et des hématozoaires. (Voir la courbe de la fig. 3.)

On le réinocule le 30 juin 1898, sous la peau, avec un demi c. c. *de virus pesteux pur*. Il contracte la peste bovine, mais offre, en même temps, des hématozoaires pendant la vie et après la mort (sang, foie, rate). Dans l'intervalle des deux infections, la santé s'était maintenue parfaite. (Voir la courbe suivante.)

L'accoutumance des races indigènes au virus malarique est

1. Toujours, pensons-nous, pour ce qui est des animaux adultes.

illimitée. On peut injecter des litres et des litres de sang virulent sans déterminer d'accidents. Cependant, le sérum des animaux ainsi traités, recueilli de 2 à 6 semaines après les inoculations massives, ne manifeste *aucun pouvoir préventif ni curatif*.

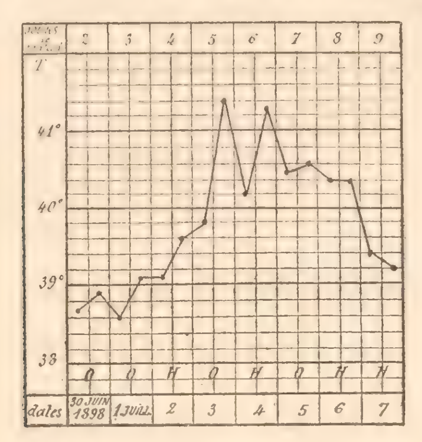


Fig. 4. B. A. 7. Deuxième inoculation.

Ce résultat nous semble peu encourageant pour la sérothérapie des affections à hématozoaires.

Les sels de quinine ont-ils une action thérapeutique sur la malaria des bovidés ? Lors de l'épidémie de Kutchuk-Tchiftlik nous n'avons pu traiter que deux animaux. L'injection de dix grammes de bichlorydrate de quinine, par jour, s'est montrée absolument inefficace : les deux vaches ont succombé. Toutefois, l'alcaloïde avait certainement agi sur les hématozoaires ; car, dans un cas, ils ont disparu totalement du sang et presque totalement des viscères ; dans l'autre, ils ont diminué considérablement ; et dans les deux, la majorité des parasites existants était profondément altérée. Nous sommes convaincus que les sels de quinine pourraient être avantageusement employés comme moyen préventif.

Mentionnons, pour terminer, la toxicité du sang malarique. Tandis que le cobaye supporte sans dommage plus de 5 c. c. de sang normal de bœuf injectés dans le péritoine, il meurt rapidement après inoculation d'un c. c. de virus hématozoïque.

Nichan Tach, février 1899.

RAPPORT
SUR LA STÉRILISATION INDUSTRIELLE DES EAUX POTABLES
PAR L'OZONE

(Procédés et appareils de MM. Marmier et Abraham.)

PAR LE Dr A. CALMETTE.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

On sait aujourd'hui que l'eau d'alimentation est très souvent le véhicule des germes de maladies infectieuses, et depuis que cette constatation a été faite, les hygiénistes et les ingénieurs s'efforcent de rechercher, en s'appuyant sur les méthodes précises des sciences expérimentales, des procédés permettant d'éliminer aussi complètement que possible les microbes pathogènes que renferment trop souvent les eaux captées par les villes.

De nombreux moyens ont déjà été proposés pour arriver à ce but. Ils peuvent se diviser en deux grandes catégories :

1° Les uns tendent à modifier les modes de captation des sources, des cours d'eau ou des nappes souterraines, de manière à éviter, autant que possible, toute cause de pollution par des germes microbiens venus de la surface du sol ;

2° Les autres ont pour objet la séparation ou la destruction des germes dont on n'a pas pu éviter la présence dans les eaux qu'il s'agit de livrer à la consommation.

Beaucoup de villes très importantes sont obligées de s'alimenter soit à des cours d'eau impossibles à préserver de multiples causes de contamination, soit à des sources captées superficiellement dans des terrains cultivés et perméables aux infiltrations de la surface.

La ville de Lille se trouve dans ce dernier cas. Elle possède, dans une vaste plaine qui s'étend le long de la vallée de la Deule, surtout aux environs du village d'Emmerin, une série de

sources qui jaillissent au milieu de marécages et de terres cultivées. La nappe aquifère qui alimente ces sources a son origine dans la craie. Sa profondeur moyenne, la disposition de ses points d'émergence et le mode de captation adopté sont tels que, pendant toute l'année, les eaux sont peuplées de nombreux germes microbiens provenant des couches superficielles du sol arable.

Ces germes abondent principalement à l'époque des grandes pluies d'automne. La détermination des espèces auxquelles ils appartiennent ne laisse aucun doute sur les dangers incessants que peut provoquer leur ingestion. On constate d'ailleurs, chaque année, d'assez nombreux cas de fièvre typhoïde dans la population lilloise ; il ne paraît pas douteux que la très grande mortalité infantile qui est relevée par l'Office sanitaire sous les rubriques « affections gastro-intestinales et athrepsie » doive être attribuée, au moins pour une large part, à la qualité défectueuse des eaux.

Justement préoccupée de cet état de choses, et désireuse de protéger le plus efficacement possible ses administrés contre les atteintes des maladies épidémiques, l'Administration municipale de Lille s'efforce, d'une part, d'augmenter dans une large mesure le débit actuel des sources d'Emmerin, devenu très insuffisant par suite de l'augmentation toujours croissante de la population ; d'autre part, d'assurer l'innocuité parfaite des eaux qu'elle est obligée de distribuer.

Presque toutes les méthodes d'épuration que l'on a proposées jusqu'ici présentent des inconvénients sérieux, surtout lorsqu'il s'agit de les employer sur une large échelle.

Les filtres de terre poreuse, excellents pour filtrer l'eau à domicile, s'ils sont bien surveillés, ont un débit trop faible et coûtent trop cher pour qu'on puisse les utiliser à épurer l'eau d'alimentation d'une ville entière. La filtration sur couches de sable améliore les eaux, mais ne donne jamais une sécurité suffisante.

La stérilisation par la chaleur est trop coûteuse pour qu'on puisse songer à l'appliquer en grand ; et, parmi les procédés d'épuration chimique, en l'état actuel de nos connaissances, le seul qui se soit montré pratiquement efficace et recommandable repose sur l'emploi de l'*ozone*.

On connaît, depuis longtemps, les propriétés énergiquement microbicides et oxydantes de l'ozone. L'application de ce gaz à la stérilisation des eaux potables a été proposée par plusieurs savants, en particulier par MM. Ohlmuller, Siemens et Halske, de Berlin, en 1891 ; plus récemment, en 1893, par MM. Tindal, Schreller et Van der Sleen, en Hollande.

Lors de l'Exposition d'hygiène de Paris organisée au Champ-de-Mars, en 1895, M. Tindal a montré la première réalisation pratique d'un appareil industriel permettant de traiter efficacement environ 2 mètres cubes d'eau à l'heure.

Cependant l'application du système n'a été effectuée dans aucune ville d'une façon régulière, et le problème de l'emploi pratique de l'ozone pour la stérilisation en masse des eaux potables restait toujours posé.

MM. Marmier et Abraham ont repris, dès 1895, l'étude de cette question, et nous pensons qu'ils lui ont fait faire un pas décisif.

Ces deux savants ont demandé, en février 1898, à l'administration municipale de Lille, l'autorisation d'installer, à l'usine élévatoire des sources d'Emmerin, un appareil industriel producteur d'ozone, en vue d'effectuer une grande expérience qui pût permettre de porter un jugement sur la valeur pratique du procédé et sur les appareils de leur invention.

Vivement intéressée par cette expérience, l'Administration municipale de la ville de Lille nous a priés de nous réunir en commission, d'en contrôler les résultats, et de lui donner notre avis sur la valeur du procédé.

Notre Commission, composée de MM. :

Dr Staes-Brame, adjoint au maire de Lille, président ;

Dr Roux, membre de l'Institut, sous-directeur de l'Institut Pasteur de Paris ;

Buisine, professeur de chimie industrielle à la Faculté des sciences de Lille ;

Dr Calmette, directeur de l'Institut Pasteur de Lille, professeur à la Faculté de médecine de Lille, rapporteur ;

Bouriez, expert chimiste ;

s'est réunie pour la première fois le 10 décembre 1898, à l'Institut Pasteur de Lille, pour l'élaboration du programme de ses travaux.

Ce programme étant arrêté, la Commission s'est divisée en deux sections : l'une, composée de MM. les Drs Roux et Calmette, s'est chargée du contrôle bactériologique ; l'autre, composée de MM. Buisine et Bouriez, s'est chargée de l'étude chimique des eaux d'Emmerin avant et après le traitement par l'ozone.

Conformément aux délibérations de la Commission, des prélèvements échelonnés d'échantillons d'eau non traitée et d'eau ozonée ont été effectués à Emmerin les 10, 11, 12 décembre 1898 et les 17, 24, 27 et 28 janvier 1899, afin qu'on pût se rendre compte de la valeur du procédé, en marche industrielle, continue et normale.

DESCRIPTION DES APPAREILS

L'essai de stérilisation des eaux est fait dans une petite usine contiguë à l'usine élévatoire des eaux de la ville de Lille.

L'installation comprend trois parties :

L'une A servant à la production du courant électrique ; la seconde B à la production de l'ozone ; la troisième C à la stérilisation de l'eau.

A — *Production du courant électrique.* — Cette partie électrique de l'usine contient un moteur à vapeur qui n'offre rien de bien particulier, et un alternateur. Le courant produit passe dans un transformateur à haut potentiel qui peut donner 40,000 volts et plus.

B — *Production de l'ozone.* — La production de l'ozone est assurée d'un façon régulière par deux appareils distincts : un ozonateur et un déflagrateur à tiges. Entre les tiges de ce déflagrateur jaillit une série d'*étincelles efficaces* dont une des fonctions consiste à assurer entre les pôles de l'ozoneur un potentiel régulier.

L'ozoneur est constitué de la façon suivante : une électrode, une glace, un intervalle, une glace, une électrode, une glace, un intervalle, une glace, un électrode, etc...

Les électrodes sont métalliques ; chacune présente deux surfaces planes opposées.

Ces surfaces sont parfaitement dressées ; sur chacune d'elles s'applique exactement une glace.

Toutes les électrodes de rang pair sont reliées à un pôle du

transformateur, celles de rang impair à l'autre pôle. Des précautions particulières ont été prises pour assurer l'isolement parfait de ces deux séries d'électrodes, pour des potentiels bien supérieurs à ceux habituellement employés.

C'est dans les intervalles des glaces que jaillit l'effluve, d'une belle couleur violette ; sous son action, l'oxygène de l'air se transforme en ozone. Grâce à un dispositif spécial, on n'extrait de l'appareil que de l'air ayant traversé l'effluve sur une longueur fixée d'avance ; toutes les particules d'air ont donc été soumises à une action uniforme de l'effluve.

La réfrigération des électrodes se fait *d'une façon continue, sans aucune interruption à la fois dans les deux séries d'électrodes. L'isolement parfait est néanmoins assuré* et il n'y a jamais de court circuit dans l'appareil. Ceci est obtenu en coupant convenablement la colonne d'eau réfrigérante au moyen de deux séries d'appareils à gouttes.

C — *Stérilisation de l'eau.* — Au sortir de l'ozoneur, l'ozone est envoyé dans une grande colonne en maçonnerie. C'est dans cette colonne qu'il rencontre l'eau à stériliser.

La stérilisation est obtenue grâce à une circulation méthodique de l'ozone et de l'eau. L'eau s'échappe au bas de cette colonne et se rend dans les réservoirs de l'usine élévatoire de la ville de Lille. Un déversoir calibré est établi sur le parcours de cette eau afin de pouvoir mesurer son débit.

CONTROLE BACTÉRIOLOGIQUE

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES DU 10 AU 25 DÉCEMBRE 1898.

Les appareils ozoneurs étaient en marche continue pendant le jour seulement, depuis le commencement du mois de juillet.

Ils ont fonctionné jour et nuit pendant les 10, 11, 12 décembre.

Le débit normal de la colonne était de 35 mètres cubes d'eau stérilisée à l'heure.

Les échantillons d'eau ozonée, destinés à l'analyse bactériologique, ont été prélevés à Emmerin dans des ballons-pipettes stériles, en même temps que des échantillons d'eau non traitée.

Le 10 décembre, l'eau non traitée a été ensemencée dans 5 ballons, à la dose de 0 c. c. 01, pour un essai préliminaire. Après 24 à 60 heures, tous les ballons étaient altérés.

Ensemencée en gélatine nutritive dans des vases plats d'Erlenmeyer, à la dose de 0 c. c. 01 et 0 c.c. 05, la même *eau non traitée* a fourni à la numération, après 7 jours, 2,200 *germes par cent. cube*, dont 180 appartenant à des espèces liquéfiantes.

L'eau ozonée après passage à la colonne stérilisante, qui contenait de l'air ozoné à une concentration de 5 milligr. 8 d'ozone par litre d'air, a fourni les résultats suivants :

Étude de l'eau prélevée le 11 déc., à 10 heures du matin [1].

Débit de la colonne : 35 mètres cubes d'eau à l'heure

Concentration : 5, 8 mgr. d'ozone par litre d'air.

Température à l'intérieur de l'ozoneur : 20°.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes		
Bouillon de viande neutre..	10	0,5	0	
— — — ..	5	1	1	*B. subtilis.*
— — — ..	1	11	1	*B. subtilis.*
— — — ..	2	12	0	
— — — ..	5	13	0	
Gélatine nutritive..........	5	1	0	
— —		2	0	

Résumé : 2 germes de *B. subtilis* pour une quantité totale de 74 cc. d'eau ozonée.

Le 11 décembre, à 5 heures du soir, on prélève à Emmerin de nouveaux échantillons d'eau brute et d'eau ozonée.

L'appareil ozoneur donnait alors une concentration de 6 milligr. 5 ; le débit de la colonne restait à 35 mètres cubes d'eau.

L'*eau brute* a été conservée 24 heures au laboratoire, à la

1. Dans ce tableau et ceux qui suivent, on trouve dans la première colonne l'indication du milieu d'ensemencement ; dans la seconde, celle du nombre des ballons ou matras ensemencés ; dans la troisième, celle de la quantité d'eau introduite dans chaque ballon ou matras ; dans la quatrième, le nombre de germes après 15 jours à 36° pour les ballons, et après 7 jours à 23° pour les gélatines. La cinquième colonne indique les espèces microbiennes observées.

température moyenne de 18°. Ensemencée le 12 après midi, elle a fourni en gélatine, après 7 jours, 3.960 *germes* dont 340 liquéfiants, par cent. cube.

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 11 DÉCEMBRE A CINQ HEURES DU SOIR.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes.		
Bouillon de viande neutre..	10	1	0	
— — — ..	5	0,5	0	
— — — ..	5	1,3	1	*B. subtilis.*
— — — ..	3	4	0	
Gélatine nutritive.........	3	1,5	2	1 moisissure. 1 *B. subtilis.*

Résumé : 2 germes de *B. subtilis* et 1 moisissure pour une quantité totale de 35 c. c. 5 d'eau ozonée.

Le 12 décembre on prélève à Emmerin :

1 ballon-pipette d'eau ozonée ;

1 second ballon-pipette de la même eau, que la Commission se propose d'analyser seulement après 4 jours pour y observer la pullulation des germes.

Les résultats de ces deux analyses sont consignés dans les tableaux ci-après.

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 12 DÉCEMBRE A 10 HEURES DU MATIN.

Concentration = 6 milligr.,5 d'ozone par litre d'air.
Température à l'intérieur de l'ozonateur 18°.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes		
Bouillon de viande neutre..	5	1,3	1	*B. subtilis.*
— — — ..	5	4	1	*B. subtilis.*
— — — ..	1	11	0	
— — — ..	1	21	1	*B. subtilis.*
Gélatine nutritive.........	4	1,5	0	
— —	3	4	0	

Résumé : 3 germes de *B. subtilis* pour une quantité totale de 76 cc., 5 d'eau ozonée.

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 12 DÉCEMBRE, A 10 HEURES DU MATIN, ET CONSERVÉE PENDANT 4 JOURS AU LABORATOIRE A 18° AVANT ENSEMENCEMENT.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes.		
Bouillon de viande neutre..	5	1	0	
— — — ..	5	0,5	0	
Gélatine nutritive..........	4	1	0	

Résumé : Aucun germe microbien dans 11 c.c. 5 d'eau ozonée, conservée avant ensemencement 4 jours au laboratoire, à la température moyenne de 18° centigr.

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Le 17 janvier 1899, une prise d'échantillon d'eau ozonée est effectuée (concentration de l'ozone, 6 milligr. par litre d'air).

Le ballon pipette est conservé au laboratoire pendant 24 heures avant les ensemencements.

Le 24 janvier, un nouvel échantillon prélevé est conservé 36 heures avant les ensemencements.

Voici les résultats de ces deux analyses :

1° EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 17 JANVIER. ANALYSÉE APRÈS 24 HEURES

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes.		
Bouillon de viande neutre..	17	1,2	0	
2° EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 24 JANVIER ET ANALYSÉE APRÈS 36 HEURES				
Bouillon de viande neutre..	2	7	0	
— — — ..	1	13	0	
— — — ..	1	15	0	

Résumé : *L'eau ozonée*, conservée 24 et 36 heures au laboratoire après le prélèvement, *reste stérile*.

Les 27 et 28 janvier 1899, une dernière série d'expériences est effectuée par la Commission sur deux prélèvements à 24 heures d'intervalle.

L'appareil ozoneur était en marche continue, c'est-à-dire jour et nuit, depuis 60 heures. Le débit de la colonne était de 35 mètres cubes d'eau à l'heure ; la concentration de 9 milligr. 3 d'ozone par litre d'air.

L'eau brute, prélevée le 27 matin, en même temps que les échantillons d'eau ozonée, fournit à la numération, après six jours, en gélatine, 1,170 germes par centimètre cube.

Un second échantillon de la même eau, prélevé le 28 matin, donne 988 colonies par centimètre cube.

Un ballon-pipette d'eau ozonée prélevé le 28 matin est réservé pour être soumis à l'analyse le 30 janvier, après 48 heures de séjour au laboratoire.

Les résultats des analyses effectuées avec l'eau ozonée les 27, 28 et 30 janvier sont consignés dans les trois tableaux ci-après :

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE A EMMERIN LE 27 JANVIER A 10 H. DU MATIN.

Concentration d'ozone : 9 milligr. 3 par litre d'air.

Débit : 35 m. cubes d'eau à l'heure.

Température extérieure : + 1°, et température à l'intérieur de l'ozoneur 13°.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes		
Bouillon de viande neutre..	20	1,2	0	
— — — ..	4	3	0	
— — — ..	4	3,5	0	
— — — ..	5	4	0	
— — — ..	2	12	1	*B. subtilis.*
— — — ..	1	16	1	*B. subtilis.*
Gélatine nutritive..........	7	3	0	
— —	3	5	0	

Résumé : 146 c. c. d'eau ozonée, répartis dans 46 ballons ou matras, ont donné : 2 germes de *B. subtilis*.

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE A EMMERIN LE 28 JANVIER A 10 H. DU MATIN.

Concentration d'ozone par litre d'air : 9 milligr. 5.
Débit de la colonne : 35 m. c. à l'heure.
Température à l'extérieur de l'ozoneur 8°.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
		cent. cubes.		
Bouillon de viande neutre..	11	1,3	0	
— — — ..	15	2,2	1	*B. subtilis.*
— — — ..	2	13	1	*B. subtilis.*
— — — ..	1	9	0	
— — — ..	2	10	0	
— — — ..	1	15	0	
— — — ..	2	18	1	*B. subtilis.*
— — — ..	1	25	1	*B. subtilis.*
Gélatine nutritive..........	6	2,2	0	

Résumé : 192 c. c. 6 d'eau ozonée répartis dans 41 ballons ou matras ont donné 4 germes de *B. subtilis*.

EAU OZONÉE PRÉLEVÉE LE 28 JANVIER A 10 H. DU MATIN : ANALYSÉE LE 30 JANVIER APRÈS 48 HEURES DE SÉJOUR AU LABORATOIRE A LA TEMPÉRATURE DE + 18°.

MILIEUX DE CULTURE	NOMBRE DE BALLONS	QUANTITÉ D'EAU	NOMBRE DE GERMES	ESPÈCES MICROBIENNES
Bouillon de viande neutre..	6	1	0	
— — — ..	6	2	0	
— — — ..	1	8	0	
— — — ..	3	10	1	*B. subtilis.*
— — — ..	1	11	0	
— — — ..	1	12	1	*B. subtilis.*
— — — ..	1	13	1	*B. subtilis.*
— — — ..	3	14	1	*B. subtilis.*
— — — ..	2	20	1	*B. subtilis.*

Résumé : 175 c. c. d'eau ozonée conservée 48 heures au laboratoire ont donné 5 germes de *B. subtilis* revivifiables par la culture en bouillon à 36°.

En présence de ces résultats excellents, la Commission a voulu se rendre compte de certains faits qui avaient attiré son attention au cours des expériences effectuées.

Il semblait extraordinaire, par exemple, que l'eau ozonée conservée 12, 24, 36 heures et même 4 jours au laboratoire, restât stérile, et se montrât relativement plus pauvre en germes

que l'eau analysée très peu de temps après la prise d'échantillons.

On pourrait supposer :

Ou bien que les quelques germes de *B. subtilis* qui échappaient à l'action de l'ozone pendant le passage à la colonne, étaient détruits ultérieurement par une très petite quantité d'ozone qui pourrait rester dans le liquide pendant les premières heures qui suivent le prélèvement;

Ou bien que l'ozonisation engendre dans l'eau des substances chimiques qui empêchent la pullulation des germes.

Pour répondre à ces questions, nous avons mélangé à 373 c. c. d'eau ozonée prélevée le 23 janvier et conservée 3 jours au laboratoire, 68 c. c. d'eau brute prélevée le 26 du même mois.

Le mélange a été ensemencé le 28, soit après deux jours de contact, à la dose de 0 c. c. 1 dans 6 matras de gélatine nutritive.

La numération des colonies effectuée après six jours de culture à 23° a donné 1,340 germes par centimètre cube. *Donc l'eau ozonée ne renferme aucune substance antiseptique capable de stériliser les germes de l'eau non ozonée avec laquelle on la mélange et d'empêcher leur pullulation.* Comme nous avons constamment remarqué que l'eau ozonée est d'autant plus pauvre en germes que les ensemencements sont faits plus longtemps après le prélèvement des échantillons, nous sommes obligés de conclure que, si le plus grand nombre des germes contenus dans l'eau est détruit pendant le passage à la colonne, la presque totalité de ceux qui échappent à cette phase de l'opération succombent après quelques minutes dans les réservoirs où s'accumule l'eau sortant des appareils.

Ce fait est très intéressant à signaler et il présente une importance pratique considérable, parce qu'il montre que l'eau ozonée, bien qu'elle ne renferme déjà plus de traces d'ozone quelques minutes après sa sortie des appareils, ne permet plus dans son sein la pullulation des germes de *B. subtilis* qui ont pu échapper à la stérilisation.

Analyse chimique. — M. Buisine, professeur de chimie industrielle à la Faculté des sciences de Lille, et M. Bouriez, expert-chimiste, étaient chargés d'effectuer l'analyse comparative des eaux d'Emmerin avant et après le traitement par l'ozone, surtout au point de vue de la teneur en oxygène, en matières organiques et en nitrates.

Il était nécessaire, en effet, de savoir si le traitement par l'ozone n'avait pas pour résultat d'augmenter dans de trop grandes proportions la teneur des eaux en nitrates, par suite de l'oxydation des matières organiques contenues dans ces eaux.

Il fallait aussi connaître les effets de l'ozone sur la teneur en matières organiques.

Voici les résultats fournis par les chimistes-experts de la Commission :

ANALYSE CHIMIQUE DES ÉCHANTILLONS D'EAU PRÉLEVÉS LE 12 DÉCEMBRE 1898

	EAU NON TRAITÉE PAR *litre.*	EAU OZONÉE PAR *litre.*
Matières organiques (évaluées en acide oxalique)...	$0^{gr},014$	$0^{gr},003$
— — (en oxygène, procédé A. Lévy).	$0^{gr},00088$	$0^{gr},00080$
Azote nitrique (en nitrate de potasse, procédé Schlœsing)..	$0^{gr},034$	$0^{gr},030$
Azote nitrique (procédé Grandval et Lajoux).......	$0^{gr},020$	$0^{gr},019$
Azote nitreux (par la métaphénylène-diamine)......	0	0
— (par la résorcine)....................	$0^{gr},0005$	$0^{gr},003$
Ammoniaque (par le réactif de Nessler)............	0	0
Oxygène dissous..	$9^{mgr},7$	$9^{mgr},8$

CONCLUSIONS

En résumé, l'ensemble des analyses bactériologiques et chimiques que nous avons faites pendant la période qui s'étend du 10 décembre 1898 au 12 février 1899 nous conduit à conclure que :

1° Le procédé de stérilisation des eaux d'alimentation par l'ozone, basé sur l'emploi des appareils ozoneurs et sur la colonne de stérilisation de MM. Marmier et Abraham, est d'une efficacité incontestable, et cette efficacité est supérieure à celle de tous les procédés de stérilisation actuellement connus, susceptibles d'être appliqués à de grandes quantités d'eau;

2° La disposition très simple de ces appareils, leur robustesse, la constance de leur débit et la régularité de leur fonctionnement donnent toutes les garanties que l'on est en droit d'exiger d'appareils vraiment industriels ;

3° Tous les microbes pathogènes ou saprophytes que l'on rencontre dans les eaux étudiées par nous sont parfaitement détruits par le passage de ces eaux dans la colonne ozonatrice. Seuls, quelques germes de *Bacillus subtilis* résistent. On compte environ un germe appartenant à cette espèce par 15 c. c. d'eau traitée avec une concentration d'ozone égale à 6 milligrammes par litre d'air.

Avec une concentration de 9 milligrammes, le nombre des germes de *B. subtilis* revivifiables par la culture en bouillon s'abaisse à moins de 1 pour 25 c. c. d'eau traitée. Il importe d'observer que le *B. subtilis* (microbe du foin) est tout à fait inoffensif pour l'homme et les animaux, et d'ailleurs les germes de ce microbe résistent à la plupart des moyens de destruction tels que le chauffage à la vapeur sous pression à 110°. Il n'est donc pas utile d'exiger sa disparition complète des eaux destinées à la consommation, et nous considérons comme très suffisante la stérilisation obtenue par l'air ozonisé avec une concentration de 5 à 6 milligrammes par litre, dans les conditions où se placent MM. Marmier et Abraham;

4° L'ozonisation de l'eau n'apporte dans celle-ci aucun élément étranger, préjudiciable à la santé des personnes appelées à en faire usage. Au contraire, par suite de la non augmentation de la teneur en nitrates et de la diminution considérable de la teneur en matières organiques, les eaux soumises au traitement par l'ozone sont moins sujettes aux pollutions ultérieures et sont, par suite, beaucoup moins altérables. Enfin, l'ozone n'étant autre chose qu'un état moléculaire particulier de l'oxygène, l'emploi de ce corps présente l'avantage d'aérer énergiquement l'eau et de la rendre plus saine et plus agréable pour la consommation, sans lui enlever aucun de ses éléments minéraux utiles;

5° En ce qui concerne la ville de Lille, notre avis est qu'il y a lieu de recommander à l'Administration municipale l'adoption du procédé de MM. Marmier et Abraham, lequel, ainsi que nous en avons acquis la certitude, assurerait l'innocuité absolue et permanente des eaux d'Emmerin qui alimentent l'agglomération lilloise.

Nous pensons aussi qu'étant donnée la sécurité de ce mode d'épuration, la ville de Lille trouverait un avantage immédiat à

augmenter le débit des sources actuelles par le simple apport d'eaux de rivière ou de canaux du voisinage, grossièrement filtrées par une digue de sable et stérilisées ensuite en même temps que l'eau des sources, au moyen des appareils ozoneurs.

Quelle que soit la profondeur à laquelle seront creusées les galeries souterraines de captation actuellement projetées aux environs de Lille, on ne peut affirmer que l'homogénéité du sol sera assez parfaite pour mettre sûrement l'eau collectée à l'abri des infiltrations de la surface. Les galeries percées dans la craie qui alimentent la ville de Reims nous en fournissent un exemple. La teneur en germes et en matières organiques de l'eau qui s'y trouve captée varie dans des proportions considérables (de 2,000 à 5.000 germes par c. c. et de 12 à 40 milligrammes de matières organiques par litre), et la fièvre typhoïde produit de fréquents ravages dans la population de cette ville.

La captation des eaux profondes au moyen des galeries ne donne donc pas aux hygiénistes une sécurité beaucoup plus grande que la captation des eaux superficielles.

Nous pensons, en conséquence, que, pour éviter la propagation des maladies infectieuses par l'eau d'alimentation, celle-ci doit, si elle est exposée à des pollutions, être stérilisée par un procédé efficace, tel que celui dont nous avons pu contrôler les résultats dans le présent rapport.

Signé :

Les membres de la Commission :

D[r] Roux; Bouriez;
D[r] Calmette, rapporteur; Buisine;
D[r] Staes Brame.

Lille, le 12 février 1899.

UNE SARCINE PATHOGÈNE

Par le Dr LOEWENBERG.

(Travail du laboratoire de M. E. Metchnikoff.)

La fétidité de l'air expiré par les fosses nasales est provoquée, la plupart du temps, par l'ozène vrai, affection caractérisée, en dehors de ses signes cliniques, par la présence d'un microbe dont nous avons signalé, dès 1884 [1], l'existence, et étudié la biologie dans ces *Annales* [2].

Depuis, nous avons vu que dans certains cas, très rares il est vrai, la fétidité de l'haleine émise par les fosses nasales peut être provoquée par l'envahissement de la muqueuse pituitaire par d'autres microbes que celui particulier à l'ozène.

Voici un cas de ce genre, dû à la présence d'une sarcine non encore décrite qui, à la différence des autres sarcines, est pathogène pour les animaux. La particularité de ce cas est encore rehaussée par sa rareté. Nous n'en n'avons rencontré qu'un seul dans le nombre considérable — il dépasse certainement mille — de personnes examinées par nous pour cause de fétidité de l'air expiré par le nez.

Étude bactériologique du microbe. — La sarcine en question a été rencontrée dans les deux fosses nasales d'une malade affectée de punaisie depuis de longues années, et chez laquelle les caractères cliniques de la maladie différaient radicalement de ceux qui caractérisent l'ozène vrai.

Le mucus nasal de la patiente se montrait composé exclusivement de leucocytes polynucléaires et d'une énorme proportion de paquets d'une même sarcine. Celle-ci présentait l'aspect caractéristique de ce genre de microbes, et a toujours montré le même aspect, sans mélange d'aucun autre microbe.

Les *cultures* en tubes et sur plaques de Petri donnaient inva-

1. 3e Congrès otologique international, Bâle, 1884 (travail reproduit dans l'*Union médicale*, 1884).
2. Voir ces *Annales*, mai 1894.

riablement de nombreuses colonies sarciniques, mais, en outre, étaient pures. Au fur et à mesure que le traitement a amené d'abord une amélioration, puis finalement la guérison complète et définitive, la proportion des paquets sarciniques dans les préparations du mucus et le nombre des colonies du microbe dans les cultures ont diminué, pour aboutir, enfin, à la disparition complète du micro-organisme et des symptômes pathologiques.

Cette sarcine est immobile : elle prend les couleurs basiques d'aniline, moins bien les couleurs acides.

Elle se colore bien par le procédé de Gram. Quelquefois, on la voit cerclée d'une espèce d'auréole. Ces auréoles se fondent parfois en une masse unique lorsque les sarcines sont rapprochées.

Dans le mucus nasal de la malade, les divers individus de la sarcine se montrent quelquefois réunis par des filaments fins, dont il est difficile de déterminer la nature, attendu que, dans certains cas, ils prennent la substance colorante qui ne les teinte pas dans d'autres. Ces fils atteignent jusqu'à 20 et même 30 fois la longueur du microbe et sont souvent ramifiés[1]. Ils sont généralement rectilignes, quelquefois cependant moniliformes.

La sarcine pousse à la température ordinaire, mais beaucoup mieux encore à celle de l'étuve. Sur les milieux solides usuels, elle forme des enduits luisants et comme moites, d'un blanc laiteux opaque, quelquefois légèrement jaunâtre. Ils sont copieux, bombés au milieu et s'étendent assez rapidement. Les colonies isolées ressemblent à des gouttelettes de lait bien crémeux.

Sur gélose, la sarcine donne de très belles cultures. Les colonies s'épaississent rapidement et présentent bien l'aspect qui vient d'être décrit, aspect qu'elles gardent très longtemps même lorsque, en grandissant, elles se fondent les unes aux autres.

Même aspect sur gélatine, qui ne se liquéfie pas même après de longs mois.

Sur les plaques de gélatine, les colonies isolées se présentent comme il vient d'être exposé, et passent, en vieillissant, légèrement au jaune. Elles se montrent noires à la lumière transmise, blanches à la lumière incidente.

1. D'après une communication orale, M. L. Martin a observé des prolongements analogues chez une sarcine retirée de la cavité buccale.

Piquée dans la gélatine, la sarcine forme, jusqu'au bout de la piqûre, un chapelet composé de grains souvent assez volumineux. En haut, apparaît une plaque blanche, à contours irréguliers lobulés ou festonnés, formés sans doute par la fusion d'un certain nombre de colonies à délimitation circulaire.

En piqûre dans la gélose, le microbe montre les grains du « chapelet » plus fins que dans la gélatine. A la face supérieure, il se forme un disque étendu, d'aspect gras et de contours irréguliers.

Sur plaques de gélose, développement comme sur gélatine ; sur les deux, les colonies présentent des contours circulaires ou ovoïdes, et toujours unis. A un faible grossissement, elles paraissent finement grenues.

Ensemencée sur la gélatine additionnée d'acide tartrique, la sarcine ne pousse pas. Il en est de même sur la pomme de terre cuite et humectée avec une solution du même acide à 3 0/0. Par contre, elle pousse copieusement sur la pomme de terre préparée à la façon ordinaire, où elle forme des colonies isolées ou des traînées d'un beau blanc, d'aspect humide, comme sur les autres milieux usuels.

La sarcine se cultive très bien dans les *milieux liquides ordinaires* où elle forme, dès le lendemain de l'ensemencement, un dépôt qui augmente de volume peu à peu, tandis que, au-dessus, le liquide reste clair.

Quand on agite le tube, le dépôt s'élève, pareil à un nuage blanc très cohérent. Le liquide demeure alcalin.

La sarcine se développe aussi dans le bouillon peptonisé, le bouillon d'ascite et la décoction de foin, mais je n'ai pas réussi à la faire pousser dans une décoction de navets.

Elle pousse bien dans le lait stérilisé, qui reste alcalin et ne se coagule pas.

Si la sarcine se présente dans le mucus nasal de notre malade sous la forme caractéristique de paquets cubiques, elle ne tarde pas à perdre ce mode de groupement significatif dans les cultures successives sur milieux solides. Elle ne se multiplie bientôt plus, dès lors, que dans deux sens perpendiculaires l'un à l'autre, de façon à former seulement des plaques à une seule épaisseur, composées de 4, 8 individus.

En outre, en continuant à l'ensemencer sur milieux solides,

on constate qu'elle se dissocie de plus en plus. Finalement ce ne sont plus que des coccus, groupés tantôt en amas, tantôt en chaînettes.

On sait, d'ailleurs, que les congénères de notre microbe, par exemple les *sarcinae aurea et lutea*, se comportent de même. Conservées dans les laboratoires et après une longue série d'ensemencements sur des milieux solides, leurs cultures ne sont plus composées que de coccus désagrégés.

Par contre, lorsqu'on sème une prise d'une de ces cultures (de notre sarcine) dans un milieu liquide, elle reprend le groupement caractéristique.

Si la sarcine croît vigoureusement sur tous les milieux usuels, elle est, en outre, très résistante. Ainsi, en empruntant la semence à de vieilles cultures desséchées depuis des mois (sur pomme de terre par exemple), nous avons réussi à la faire pulluler de nouveau.

Notre sarcine pousse bien en *culture anaérobie*, sans y dégager ni gaz ni odeur.

Détermination de l'espèce microbienne. — Notre sarcine ne saurait être confondue avec un autre microbe, avec lequel elle n'est pas sans présenter quelques ressemblances. Nous voulons parler du *micrococcus tetragenes*. Mais ce microbe ne prend pas la forme sarcine.

Les caractères signalés ci-dessus semblent en outre la distinguer des autres espèces de sarcines déjà connues. Dans une étude récente sur ce groupe, M. Stubenrath [1] rejette le plus grand nombre des espèces de sarcines à colonies blanches établies avant lui, et les réunit toutes sous les trois dénominations suivantes : *alba*, *variabilis* et *canescens*. Or, aucune de ces trois ne correspond à la nôtre, attendu qu'elles liquéfient la gélatine et donnent, en culture anaérobie, un dégagement abondant de H^2S, propriétés qui font défaut à notre microbe.

Propriétés pathogènes de la sarcine. — La nouvelle sarcine se distingue en outre de toutes les autres en ce qu'elle est pathogène pour les animaux. Jusqu'ici on n'a encore reconnu des propriétés pathogènes à aucune sarcine, témoins les multiples

1. F. C. STUBENRATH, Das Genus sarcina, Munich, 1897.

expériences de Salkowski et Leube[1], Welcker[2], de Bary[3], Hauser[4], Hasse[5], etc., qui ont injecté aux animaux de fortes doses de sarcines par les différentes voies, même dans la jugulaire, sans obtenir aucun effet pathologique. Stubenrath a également échoué et conclut ainsi : « Aucune sarcine n'a été reconnue comme pathogène pour l'homme ni pour les animaux[6] ».

Notre sarcine, au contraire, est pathogène pour les animaux de laboratoire, ainsi que cela ressort de nos expériences, que nous allons exposer brièvement.

Les inoculations furent pratiquées de la façon suivante : une culture de 24 heures sur gélose fut raclée et diluée avec 5 c. c. d'eau ou de bouillon stérilisés. De ce mélange, les lapins et les cobayes reçurent chacun 2 c. c. dans la cavité péritonéale, tandis que le c. c. restant fut injecté sous la peau d'une souris blanche.

Les animaux ainsi inoculés mouraient dans les 24 heures. En employant des cultures plus vieilles, la survie pouvait être plus longue.

A l'autopsie, on constatait chez les cobayes une péritonite des plus intenses. La cavité abdominale contenait en quantité considérable un liquide jaune grisâtre, louche et très visqueux. L'intestin grêle se trouvait parfois rougeâtre et fortement diarrhéique. Au microscope, l'exsudat contenu dans la cavité abdominale se montrait composé d'une « purée » de sarcines entremêlées de quelques leucocytes. Sa culture donnait, en raison de l'extrême abondance des colonies, une bande confluente composée de sarcines, surtout de belles tétrades. Dans certaines cultures, celles-ci étaient, presque toutes, réunies entre elles par des filaments analogues à ceux décrits plus haut et qui prenaient bien la fuchsine.

La rate était petite. Le foie se trouvait congestionné. Ces deux organes présentaient beaucoup de sarcines à leurs surfaces mais n'en montraient aucune dans leurs tissus.

1. Salkowski et Leube, Die Lehre vom Harn, Berlin, 1852, p. 452.

2. H. Welcker, Ueber Sarcina etc. *Zeitsch. f. ration. Medicin.*, 1859, p. 199 et suiv.

3. Gustave Hauser, Ueber Lungensarcine. *Deutsch. Archiv. fur Klin. Med.*, 1888, p. 127 et suiv.

4. De Bary, Vorlesungen ueber Bakterien, 1885, p. 93.

5. H. E. Hasse, Beobachtungen ueber die Sarcina ventriculi 1847, cit. d'après Stubenrath.

6. *Loc. cit.* p. 84 et 87.

Les capsules surrénales étaient plus foncées et infiltrées d'un exsudat hémorragique.

La plèvre contenait un exsudat louche, quelquefois sanguinolent, renfermant quelques sarcines. Pas de microbes dans le poumon: celui-ci surnageait et ne présentait aucune altération.

Le sang du cœur était coagulé. Au microscope, il ne montrait pas ou très peu de sarcines, mais ses cultures donnaient toujours des colonies pures, quelquefois abondantes, au point de former une couche confluente d'un beau blanc laiteux.

Quant aux lapins inoculés, il y en eut qui survécurent à des doses sûrement mortelles pour les cobayes. Les autres succombaient à des infections assez rapides, quelquefois même dans les 24 heures.

Voici les lésions que l'autopsie révélait chez eux : Péritonite généralisée; péritoine très congestionné. Liquide ascitique presque clair, filant et gélatineux. Chez quelques lapins, on voyait des masses presque concrètes, ressemblant à du pus épaissi, qui recouvraient les bosselures et surtout les étranglements du gros intestin.

Foie très hyperémié, rate petite, capsules surrénales normales. Plèvre contenant un liquide clair qui donnait une culture pure de sarcines.

Sang du cœur : même résultat que chez les cobayes.

L'exsudat péritonéal, de même que les masses concrètes recouvrant le colon, se composaient d'innombrables sarcines, de quelques leucocytes polynucléaires et de peu d'hématies.

Les cultures donnaient une bande confluente et étaient pures.

Les souris blanches, injectées sous la peau du dos, mouraient dans les 24 heures. L'autopsie ne montrait, en général, aucune lésion appréciable à l'œil nu. Chez une souris cependant, il y eut une péritonite généralisée et du liquide dans les sacs pleuraux. Le sang de tous ces animaux renfermait quelques sarcines et donnait sur gélose, dans les 24 heures, une culture pure en bande continue.

Le microbe devint petit à petit moins actif pour les lapins et les souris, tout en continuant à tuer les cobayes dans les 24 heures. Les lapins et les souris mouraient dans des délais de plus en plus longs, et, finalement, résistaient tout à fait.

Plus tard, les cobayes survivaient parfois à l'inoculation dans la cavité abdominale de doses massives d'une culture fraîche.

Quand nous nous sommes aperçu de ce fait, la malade qui nous avait fourni le microbe, et sur laquelle nous comptions pour le retrouver avec sa virulence originelle, avait subi l'influence favorable du traitement indiqué et était absolument guérie. De nombreuses prises du mucus ne donnèrent plus aucune colonie de sarcines.

Des injections massives dans le péritoine des cobayes, animaux très sensibles, furent impuissantes à rendre au microbe sa virulence perdue. Il en fut de même pour des cultures en sacs de collodion introduits dans la cavité péritonéale de différents cobayes.

A quoi est dû le caractère pathogène de la sarcine que nous venons d'étudier? Ce n'est certainement pas à une association microbienne, car la sarcine était seule dans les fosses nasales. Peut-être est-ce à une déviation de la sécrétion de la pituitaire, qui s'est toujours trouvée alcaline chez notre malade, tandis qu'elle est habituellement neutre. N'ayant pas vu cette malade lorsqu'elle était en santé, il nous est impossible de dire si cette alcalinité du mucus est la cause ou le résultat de l'implantation du microbe qui rend alcalins ses milieux de culture. A ce propos, il est intéressant de rappeler que le mucus nasal est également alcalin dans tous les cas d'ozène vrai. Une seule fois, nous y avons trouvé la sécrétion nasale neutre; c'était chez une petite fille punaise où le microbe spécial était associé avec un autre bacille[1].

Enfin, quant à la relation entre la fétidité de l'haleine et la présence de la sarcine, elle n'est établie que par ce fait que, la sarcine disparue, la fétidité a disparu en même temps. Nous n'avons pas réussi à l'établir autrement; car nos tentatives d'implantation de la sarcine dans les fosses nasales, chez les lapins et les cobayes, ont échoué. D'autre part, les cultures de la sarcine ne nous ont présenté aucune odeur appréciable, contrairement à celles du cocco-bacille de l'ozène vrai, qui ont une odeur très prononcée[1].

1. V. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, mars 1894.

RECHERCHES SUR LA FIÈVRE RÉCURRENTE

Par le Dr J. BARDACH

Privat-docent de bactériologie à l'Université d'Odessa.

Une courte épidémie de fièvre récurrente a sévi à Odessa pendant le printemps de l'année 1897.

J'en ai profité pour faire des observations et quelques expériences [1].

Dans la 2e livraison de ces *Annales* de l'année 1896, M. Gabritchewsky a publié un mémoire dans lequel il indique une nouvelle propriété intéressante du sang de l'homme et du singe ayant subi la fièvre récurrente; ce sang détruit les spirilles d'Obermeyer qu'on y introduit. Ce phénomène a lieu d'autant plus vite et plus complètement que le sang a été puisé plus tôt après la crise.

Les spirilles subissent différentes modifications : ils gonflent, se déroulent, deviennent immobiles, granuleux, et finissent par se désagréger complètement.

M. Gabritchewsky regarde cette propriété comme étant en relation de causalité avec l'augmentation graduelle du pouvoir spirillicide qui se produit dans le plasma sanguin avant la crise : ce plasma reçoit à ce moment des corps correspondants aux « anticorps » de Pfeiffer.

J'ai profité de l'occasion pour vérifier ces observations.

I

Le sang, puisé chez le malade avec toutes les précautions nécessaires, était mis en gouttes suspendues et entourées par de la paraffine. Quelques-unes de ces préparations étaient gardées à la température de la chambre (16-20°), d'autres à l'étuve à 36°,5. Elles étaient examinées tous les quarts d'heure. Toutes mes observations ont été faites avec des gouttes suspendues et je ne vois aucun inconvénient à ce procédé.

1. Je remercie les Drs Rosenstein et Villenz, qui ont bien voulu mettre leurs malades des hôpitaux à ma disposition.

Les spirilles se conservent pendant 3-4 jours en gouttes suspendues à la température de la chambre. D'après mes expériences, ils périssent notablement plus vite à la température de 36°,5. Ainsi, dans le sang humain, ils ne persistent que pendant 18-48 heures, et pendant 23 à 57 heures dans celui du singe.

Vu la fragilité des spirilles, il est probable que les plus faibles d'entre eux périssent déjà pendant leur extraction des vaisseaux. Le changement de milieu, produit par la coagulation du sang, doit leur être nuisible, et c'est peut-être justement cela qui abrège leur existence. La coagulation peut être accompagnée de la formation de nouveaux produits dans le sérum. Il est possible qu'une température élevée favorise l'action nocive de ces produits.

Il est évident qu'on ne peut juger de la durée des spirilles dans l'organisme par ce qui se passe *in vitro*.

Ainsi les spirilles de B. (voir le tableau I, expériences *a*, 24/III) ont vécu hors de l'organisme pendant 28 heures à la température de 36°,5. Par contre, dans l'organisme ils vécurent au moins 40 heures.

Dans l'expérience du 25/III, les spirilles vécurent 18 heures hors de l'organisme et 16 dans l'organisme. Dans l'expérience *b* les spirilles pris chez K le premier jour de l'accès, vécurent *in vitro* pendant 17 heures, et dans l'organisme humain pendant 108 heures.

La durée relativement courte de leur vie dans cette expérience peut être expliquée par le fait que ces spirilles étaient peu nombreux et qu'ils n'avaient pas eu le temps de s'adapter. Pris le lendemain chez le même malade, ils vécurent *in vitro* pendant 27 heures et 84 heures dans l'organisme ; le 3e jour, 48 *in vitro* et 60 dans l'organisme ; le 4e jour, 45 *in vitro* et 36 dans l'organisme.

Dans les expériences suivantes, les spirilles vécurent *in vitro* à la température de 36°,5 pendant 21, 27, 30 et 31 heures, et dans l'organisme 108, 5, 84 et 60 heures.

Comme on voit, il n'y a pas de corrélation entre la durée de la vie *in vitro* et *in vivo*.

Nous retrouvons le même manque de corrélation chez le singe, comme c'est démontré par le tableau III. Par exemple dans l'expérience 1re, ces spirilles ont vécu *in vitro* à la tempéra-

ture de 36°,5 pendant 57 heures, et dans l'organisme pas plus de 18 heures. Ce fait est encore plus frappant dans l'expérience 2 : les spirilles disparaissent dans l'organisme après 6 heures, et après 40 heures à l'étuve.

Dans l'expérience 3, les spirilles disparaissent du sang en 2 heures et vivent *in vitro* pendant 28 heures.

L'inverse a lieu dans l'expérience 5 : les spirilles résistent dans l'organisme pendant 108 heures et seulement pendant 36 *in vitro*. Les expériences prouvent donc que la durée de la vie des spirilles *in vitro* et *in vivo* n'est en aucune corrélation régulière.

Je reviens aux expériences de l'action du sang apyrétique sur les spirilles. Dans la majorité de nos observations, nous avons constaté — d'accord avec Gabritchewsky — l'action spirillicide du sang apyrétique. Mais en même temps il faut observer que les limites de cette action varient beaucoup.

Ainsi les spirilles vivent de 1 à 36 heures à la température de 36°,5, et de 4 à 80 heures à la température de la chambre. Du reste, comme l'a indiqué Metchnikoff, on observe aussi de grandes variations du pouvoir bactéricide dans les expériences de Gabritchewsky. *Ivanoff* indique aussi ces variations dans son article.

D'après quelques expériences, on aurait pu se croire autorisé à conclure à une relation entre la crise et l'augmentation rapide du pouvoir spirillicide du sang. Ainsi par exemple, dans l'expérience F (tableau II), les spirilles meurent, le 7me - 8me jour de l'apyrexie, en 1 1/2 à 4 heures à la température 36°,5, et après 8 heures à la température ordinaire. Dans l'expérience H, les spirilles meurent le 8me et 9me jour de l'apyrexie après 1 heure, — 1 3/4 à la température 36°,5, et après 4-8 heures à la température ordinaire. Ici le pouvoir spirillicide marqué coïncide avec le fait qu'il n'y a eu que deux accès, tandis que dans l'épidémie que je décris, il y a eu généralement 3 et rarement 4 accès. Mais si nous nous adressons aux autres expériences, comme par exemple à l'expérience A, nous allons voir que le malade C (tableau II) ayant subi une forte fièvre récurrente avec trois accès (41° pendant la 2me rechute et 40° pendant la 3me rechute), présente un sang qui, dès le premier jour, après la crise, n'a qu'un pouvoir spirillicide très faible (les spirilles vivent pen-

dant 24 heures à la température de 36°,5, et 47 heures à la température ordinaire).

Chez le malade B (tableau I), les spirilles vécurent pendant 18-22 heures dans les mêmes conditions, mais sans qu'on ait ajouté de sérum spirillicide.

Il est donc tout à fait impossible de voir, dans cette expérience, une relation entre la crise et le pouvoir spirillicide.

L'expérience faite avec le sang apyrétique du 2me jour chez les mêmes malades permet de conclure à une augmentation très prononcée du pouvoir spirillicide. Ceci est évidemment tout à fait en désaccord avec le passage des produits spirillicides dans le sang pendant la crise (tableau II, 7 et 28), car il devrait y en avoir plus le premier jour que le second.

Ainsi ce pouvoir spirillicide paraît être non pas la cause, mais plutôt la suite de la crise.

L'influence réciproque de deux sérums mélangés doit aussi jouer un certain rôle. Ainsi le même sérum (C), mélangé avec le sang d'un autre malade, sang contenant des spirilles, n'avait qu'un pouvoir spirillicide très faible (23 heures à 36°,5).

Nous ne pouvons expliquer ce fait par une différence dans l'état des spirilles, car, dans les deux cas, on avait employé le sang du 3me jour du 2me accès.

Dans l'expérience D (tableau II du 6/IV), les spirilles meurent après 9 heures dans le sang apyrétique du *premier* jour après le 2me accès. Si on les introduit dans le sang du même malade pris le *second* jour, ils n'y restent vivants que 5 heures; on observe donc, dans ce cas, non pas une diminution du pouvoir spirillicide comme on aurait pu le croire, mais, au contraire, un accroissement de ce pouvoir.

Les spirilles moururent après 6 heures dans le sang apyrétique du même malade (V), sang pris le premier jour après la crise du 3me et dernier accès. Si le pouvoir spirillicide du sang était en relation avec l'acquisition de l'immunité, il faudrait s'attendre à une augmentation de ce pouvoir après le 3me accès; nous avons vu par contre qu'il était moindre que le 2me jour après le second accès, et qu'il avait diminué presque du double après le 3me accès. L'expérience (J) prouve que l'immunité acquise n'est pas en relation de cause avec la mort plus ou moins prompte des spirilles *in vitro* dans le sang apyrétique. Ainsi les spirilles mou-

raient après seulement 36 heures pendant le 10e jour de l'apyrexie après le 2e et dernier accès, tandis que l'immunité était déjà élaborée par l'organisme après ce 2e accès, puisqu'il n'y en a pas eu de 3e.

Dans cette expérience, on voit aussi que le mélange des deux sérums (le sérum apyrétique et le sérum contenant les spirilles) joue un certain rôle : ainsi les spirilles mouraient après 20 heures dans le sang de ce même malade (exp. I, 9 IV) le 3e jour de l'apyrexie, tandis que, le 19e jour, ils mouraient après 10 h. (les variations s'expliquent probablement, non pas par le pouvoir spirillicide seul, mais aussi par l'influence réciproque des sérums).

Dans l'expérience G (5/IV) nous observons de nouveau la mort rapide des spirilles au bout de deux heures.

Si on admet que les spirilles pris le 6e jour du 1er accès (chez C) meurent si rapidement parce qu'ils sont déjà affaiblis, — nous devrons exclure cette supposition dans l'expérience suivante du 6 IV, faite avec le sang apyrétique du même malade (pris le second jour du 2e accès qui avait duré encore 3 jours) et mélangé avec du sang contenant des spirilles. Car ici aussi les spirilles meurent dans deux heures. Nous retrouverons ce même pouvoir spirillicide accentué dans l'expérience G 8/IV : le 4e jour après la crise, les spirilles meurent dans 1 1/2 et le 6e jour dans 2 heures. Néanmoins le malade eut une 2e rechute le 3e jour.

Par suite, s'il était permis de transporter les conclusions des observations faites *in vitro* sur ce qui a lieu dans l'organisme, il paraîtrait impossible d'expliquer pourquoi tout le sang spirillicide n'a pas pu tuer le petit nombre des spirilles ayant résisté dans l'organisme, et n'a pas pu empêcher le 2e accès. Nous allons voir qu'on ne peut expliquer ce fait par une hypothèse des spores.

Le tableau ci-joint montre combien varient les résultats des observations dans chaque cas.

Pourtant nous devons indiquer que dans une grande partie des cas avant la crise ou bien les jours qui la suivent, — il se développe dans le sang (hors de l'organisme) des produits qui rendent le sérum spirillicide.

Cette propriété, que Gabritchewsky a indiquée le premier, n'est pas la cause de la crise, mais serait, à ce qu'il paraît, plutôt le résultat de celle-ci.

Les observations faites sur les singes ne donnent pas non plus d'indications sur les relations de causalité entre la crise, l'immunité acquise et la propriété spirillicide.

Ainsi les expériences 1, 2 et 3 (tab. III) prouvent que le sang du singe normal a une propriété spirillicide, tandis que d'après Gabritchewsky cette propriété ne serait que le résultat de la maladie supportée.

Il est bien plus naturel de supposer que le mélange de deux sérums produit une substance toxique pour les spirilles.

L'expérience 3 démontre que le sérum d'un singe normal et celui d'un singe malade, pris 12 heures après la crise, ne diffèrent presque pas par rapport à leurs propriétés spirillicides. Le premier tue les spirilles après 19 heures, le second après 18, tandis que, sans ces sérums, les spirilles vivent pendant 30 heures.

Dans l'expérience 4, on mélangeait chaque jour, pendant toute la durée de la maladie, le sérum IV pris 4 heures après la crise avec les spirilles du singe VIII.

Pendant quatre jours la propriété spirillicide oscillait entre 15 et 20 heures ; on aurait pu s'attendre à ce que le pouvoir spirillicide augmentât à mesure de l'affaiblissement des spirilles. Sans l'addition du sérum, les spirilles vivaient de 23 à 29 heures.

Dans l'expérience 3, les spirilles furent détruits par ce même sérum après 21 h. tandis que, dans le sang du singe qui avait fourni ce sérum, les spirilles ne vécurent que pendant 2 heures.

Les données du tableau III ne plaident pas en faveur d'un pouvoir spirillicide prononcé chez les singes. Pourtant, il devrait être plus accusé que chez l'homme, car les singes ne prennent pas la maladie dans les conditions naturelles : ils n'ont pas de rechutes dans la grande majorité des cas, et leur maladie est d'une durée bien plus courte que chez l'homme.

L'addition de sang apyrétique provoque presque toujours les modifications suivantes : les spirilles, d'habitude extrêmement mobiles, perdent de plus en plus leur mobilité. Ils se rassemblent en groupements caractéristiques étoilés, dans lesquels chaque spirille conserve nettement sa structure.

Avant de mourir, les spirilles deviennent de plus en plus immobiles, et on les voit se raidir en conservant pourtant leur forme spirale.

Quelques-uns ont l'aspect presque bacilliforme. Ces spirilles

prennent bien les colorations habituelles, même seulement après un long contact avec le sérum apyrétique. On n'en rencontre point de déformés, de granuleux ou de renflés, ni parmi les vivants, ni sur les préparations colorées. Ils meurent en grande majorité tels quels. Je pense que les rares formes renflées et granuleuses qu'on trouve sur quelques préparations doivent être considérées comme des modifications post-mortelles.

Ainsi, en observant dans une goutte suspendue des spirilles dont la mobilité commence à diminuer, on voit que d'abord les mouvements en tourne-vis se transforment en mouvements onduleux, les spirilles se plient en deux et ne restent mobiles qu'à un bout, leurs balancements deviennent de plus en plus faibles, et enfin les spirilles s'étendent et s'immobilisent.

Ce n'est qu'après un certain temps (1/4, 1/2 heure), qu'on observe dans quelques-uns d'eux un certain renflement du milieu et des granulations; la majorité des spirilles morts disparaît au contraire sans se modifier, comme dissouté.

Les spirilles granuleux se colorent difficilement.

Je n'ai jamais pu observer de vraie agglutination dans toute la durée de mon travail.

La comparaison des modifications subites par les spirilles dans une goutte de sang d'un homme malade, ou dans celui d'un singe inoculé, prouve qu'il n'y a qu'une différence de temps dans la disparition des spirilles du sérum spirillicide.

Je passe aux expériences sur les singes.

M. Gabritchewsky admet la possibilité de l'existence de spores ou d'un état de résistance chez les spirilles, à l'aide desquels ils échappent à l'action du sérum spirillicide. De ces spores se développeraient les spirilles, en donnant ainsi lieu à la rechute.

Ainsi que l'a dit Metchnikoff, même en acceptant cette hypothèse, il serait tout à fait incompréhensible comment les spirilles développés pendant l'incubation du 2[e] ou 3[e] accès auraient pu échapper à la destruction, lorsque en ce moment le pouvoir spirillicide du sang est encore très élevé. Gabritchewsky émet la supposition que les spirilles passent dans la rate et y sont digérés par les polynucléaires. Les spirilles seraient déjà affaiblis à ce moment par l'action des substances spirillicides abondamment réparties dans la circulation pendant la crise. Par contre, les expériences de Metchnikoff prouvent que la rate des singes

(au moment de la crise) contient des spirilles virulents, capables de provoquer la maladie chez un autre singe si on les lui inocule.

Vu l'importance de cette observation fondamentale, j'ai fait l'expérience suivante :

Le 2/IV j'inoculai à un singe (*Macacus nemestrinus* I) du sang de rate contenant des spirilles. Le 5/IV, le sang du singe inoculé contenait des spirilles en petit nombre; le 6/IV la température atteignit vers le soir 41°,2, et le sang contenait encore des spirilles; pendant les oscillations ultérieures de la température, le nombre des spirilles diminuait toutes les demi-heures, il y avait des champs visuels entiers sur lesquels on n'en trouvait point; les spirilles isolés qu'on pouvait encore observer se coloraient normalement et ne présentaient aucuns signes de dégénérescence. Le singe fut tué le 6/IV par du chloroforme. A ce moment, la température était de 40°,8 et son sang contenait très peu de spirilles. Sa rate fut aussitôt broyée dans du bouillon, et cette émulsion divisée en deux parties. L'une d'elles fut inoculée à un singe (II *Cercopithecus griseoviridis*). Le 10/IV la température atteignit 39°,5. L'accès dura pendant 48 heures, il était tout à fait caractéristique et le sang contenait des spirilles pendant toute sa durée.

Cette expérience prouve donc que vers la fin de l'accès, quand il n'y a presque plus de spirilles dans le sang, ils se rassemblent dans la rate en conservant complètement leur vitalité et leur virulence. Il ne peut donc être question d'un affaiblissement des spirilles dans la rate. Il est très facile de se convaincre qu'ils sont réellement englobés par les phagocytes. Une simple coloration par le violet de gentiane montre les polynucléaires complètement bourrés de spirilles, ainsi que l'avaient antérieurement décrit Metchnikoff et Soudakewich.

L'examen le plus minutieux des préparations de la rate n'y révèle point la présence de spirilles libres. Donc les phagocytes polynucléaires de la rate englobent tous les spirilles vers la fin de l'accès, et tandis qu'on en trouve quelques-uns, isolés et libres dans le sang, on n'en rencontre plus dans la rate de non englobés. Malgré cela, ils y sont vivants et virulents encore pendant des heures.

L'autre partie de la même émulsion de la rate a servi à une seconde expérience.

S'il y a réellement des spores ou des formes résistantes des spirilles, on pourrait admettre qu'à la suite de conditions défavorables dans le sang, il s'en forme dans la rate. On sait que les spores supportent un chauffage d'une 1/2 heure à 60°. Donc le reste de l'émulsion de la rate fut chauffé pendant une demi-heure à 60° et inoculé à un singe (III, *Macacus griseoviridis*). Il fut observé depuis le 6/IV jusqu'au 18/IV. Son sang ne contenait pas de spirilles et sa température ne s'éleva pas même jusqu'à 39°. On examinait le sang chaque jour, toutes les 2 à 3 heures. Cette expérience prouve que du moins vers le commencement de la crise, il n'existe pas d'état plus résistant que le spirille lui-même. Mais, peut-être, les spores se forment-elles plus tard, pendant les premières heures après la crise?

Afin d'élucider cette question, un singe (IV, *Macacus rhesus*) fut inoculé le 8/IV avec du sang pris chez le singe du 6/IV le soir. Le 11/IV on trouva dans son sang des spirilles et l'accès dura jusqu'au matin du 13/IV. 4 heures après la constatation de la disparition des spirilles, le singe fut tué par le chloroforme, sa température était normale (38°,2). Une émulsion fut faite avec la rate et on en inocula 2 c. c. à un singe (V, *Cercop. griseoviridis*). Le 17/IV, il eut un accès typique de fièvre récurrente qui dura pendant 48 heures. Son sang contenait des spirilles.

Ainsi, 4 heures après la disparition complète des spirilles du sang, — la rate contient des spirilles vivants et virulents puisqu'ils provoquent la maladie.

En admettant que c'est le pouvoir spirillicide qui est cause de la crise, on ne s'expliquerait pas son impuissance à tuer des spirilles déjà affaiblis et englobés par les cellules.

Sur des préparations colorées on constate l'absence complète de spirilles libres; ils sont tous englobés par les polynucléaires dont quelques-uns en sont complètement remplis.

Si les formes de résistance ne se sont pas produites au commencement de la crise, peut-être ont-elles pu se former les premières heures après la crise?

Pour le savoir, nous avons chauffé le reste de l'émulsion à 58-59° pendant une demi-heure et nous en avons injecté 2 c. c. à un singe (VI, *Cercopit. griseoviridis*). On observa ce singe jusqu'au 25/IV sans avoir pu constater de fièvre récurrente.

L'examen journalier et répété du sang ne démontra pas la

présence de spirilles. Ainsi cette expérience parle aussi contre l'existence des spores.

La 3e expérience fut faite afin de chercher si la rate contenait encore, 12 heures après la crise, des spirilles ou des spores vivantes et virulentes.

Le singe II (*Cercopit. griscoviridis*) fut tué le 12/IV, 12 heures après la constatation de la disparition de ses spirilles. Soudakevitch indique dans une de ses expériences que déjà 10 heures après la crise, il ne réussissait pas à démontrer d'une façon absolue la trace des spirilles dans les phagocytes de la rate.

La coloration habituelle des préparations étalées ne nous permit pas non plus de constater de traces précises des spirilles.

Mais on pouvait supposer que s'il restait quelques spirilles vivants ou bien leurs formes résistantes, — on pourrait le démontrer par une inoculation qui, dans ce cas, devrait au moins provoquer un faible accès.

Dans le but d'élucider cette question, nous inoculâmes le 12/IV à un singe (VII. *Macacus nemes*), 2 c. c. d'une épaisse émulsion de la rate. Le singe inoculé fut observé pendant 12 jours sans présenter aucun signe morbide. Les examens multiples et journaliers du sang ne dévoilèrent pas la présence de spirilles. Ainsi, 12 heures après la crise, on ne peut démontrer non plus par inoculation la présence de spirilles ou des formes résistantes supposées.

D'accord avec la plupart des auteurs antérieurs, l'examen des préparations colorées du foie, de la moelle des os, des glandes lymphatiques, des poumons, des reins, — démontra l'absence complète de spirilles dans tous ces organes. Nous n'avons pas de raison d'y supposer la présence de spores, puisque les spirilles y sont absents ; d'autant plus que nous n'avions pas trouvé de spores dans la rate au début de la crise, moment de la plus grande accumulation des spirilles dans cet organe.

Nous pouvons tirer la conclusion suivante de cette série d'expériences : pendant la crise et les premières heures après, la rate contient dans ses cellules polynucléaires des spirilles vivants, non affaiblis et virulents. Elle ne contient pas de spores, même plus tard, après 12 heures.

Le pouvoir spirillicide du sang ne peut servir d'explication à la crise dans la fièvre récurrente.

Passons à une autre série d'expériences, et notamment à l'injection de carmin et de charbon de bois pulvérisés dans le sang du singe, injection suivie par l'inoculation des spirilles.

Ponfick a démontré que des particules de poudre de charbon introduites dans la circulation s'amassent dans les cellules amiboïdes du foie, de la rate et de la moelle des os. Un envahissement considérable du sang par ces particules est suivi d'un aussi fort englobement par les phagocytes sanguins. L'animal inoculé par des microbes après que ses phagocytes ont englobé les particules charbonneuses, devient plus sensible ou bien perd son insensibilité contre l'infection. Si la quantité de poudre charbonneuse introduite est grande, l'animal peut même succomber (p. ex. dans mes expériences avec le charbon inoculé à un chien auquel j'avais injecté de la poudre de charbon).

Puisque ce sont les phagocytes polynucléaires de la rate qui jouent à eux seuls le rôle dans la crise de la fièvre récurrente, et que ce sont ces mêmes cellules qui englobent les particules pulvérisées et insolubles introduites dans l'organisme, il était permis de supposer que les singes, infectés après avoir été inoculés avec de la poudre de carmin ou de charbon, réagiraient contre l'infection différemment des singes normaux.

Donc, le 11/IV on injecta dans la veine crurale d'un singe (VIII, *Macacus rhesus*), près de 150 c. c. de poudre de carmin en suspension dans une solution de NaCl à 0,6 0/0. La peau fut recousue et guérie par première intention. En même temps, le singe fut inoculé par le sang d'un autre singe, sang contenant des spirilles (2e jour de l'accès). Le quatrième jour, 14/IV, vers le soir, on constata l'apparition de spirilles chez le singe inoculé ; ils persistèrent jusqu'à la fin du 18/IV, en quantité assez restreinte ; leur forme et leurs mouvements étaient normaux.

Le 19/IV, ils disparurent. La quantité des spirilles pendant les deux derniers jours était ce qu'elle est habituellement pendant les dernières heures qui précèdent la crise.

On ne put observer d'élévation de température avant la crise, malgré des observations faites chaque demi-heure. L'abaissement de la température et la disparition des spirilles avaient plutôt un caractère lytique.

Généralement les singes supportent bien la fièvre récurrente ; ce n'est que dans les dernières heures de l'accès, et surtout avant

l'élévation de température qui précède la crise, qu'ils sont très abattus, ne mangent pas, se blottissent dans un coin et boivent avec avidité.

Par contre, le singe ayant reçu la poudre de carmin était très faible et abattu pendant toute sa maladie ; il avait beaucoup maigri après la chute définitive de la température, et se rétablissait très lentement.

Je ne me permets pas de tirer des conclusions de cette expérience, car j'ai remarqué, le lendemain de l'expérience, que les téguments cutanés du singe avaient pris une teinte rose rougeâtre; l'urine avait la même teinte, et le singe était abattu encore avant le début de la maladie.

Evidemment, une partie du carmin s'était dissoute, circulait dans l'organisme, et s'éliminait par l'urine. Ce n'était donc pas un dépôt de carmin non dissous qui avait lieu dans ce cas, mais bien une solution carminée qui circulait dans l'organisme. Nous pouvons toutefois signaler que la maladie dura notablement plus longtemps dans l'organisme affaibli.

La première expérience d'injection de charbon pulvérisé ne réussit pas, car le singe succomba à une embolie d'une branche de l'artère pulmonaire. Par suite, dans les expériences suivantes, j'employais de la suie, soigneusement lavée consécutivement dans de l'éther, de l'alcool et de l'eau.

Le 18/IV, on injecta à un singe (le n° III,) qui avait été antérieurement inoculé avec une émulsion de rate, chauffée à 60°, et n'avait pas pris la maladie) près de 150 c. c. d'une solution de NaCl à 0.6 0/0, contenant une suspension épaisse de la suie.

L'injection fut faite dans la veine de la jambe et la peau incisée fut recousue. La plaie guérit par première intention.

Le 22/IV, la température monta à 40°,4 ; des spirilles apparurent dans le sang et y persistèrent pendant cinq jours, même à la température de 38°,2. Les derniers deux jours (25-26/IV), on observait peu de spirilles dans le sang, leurs mouvements étaient aussi vifs que d'habitude, et colorés ils avaient leur aspect caractéristique.

Il est à signaler que l'accès n'avait pas son caractère usuel : ainsi nous n'avons pas pu observer de crise, et la température baissa graduellement pendant deux jours au lieu de quelques heures. Bien que la température fût ultérieurement (le 1/V)

élevée jusqu'à 39°.1, on n'observait plus de spirilles. Cette élévation était due sans doute à la présence d'un foyer tuberculeux du poumon droit qui fut trouvé à l'autopsie. Le singe mourut le 3/V.

Il avait un échinocoque multilobulé du foie et des échinocoques nombreux du péritoine. Les phagocytes de la moelle des os, du foie, des poumons et de la rate contenaient de la poudre de charbon.

Malheureusement, cette expérience ne peut pas être regardée comme probante, par suite des données de l'autopsie, tuberculose et échinocoques.

Il faut toutefois signaler la marche anormalement lente de l'accès et sa terminaison lytique.

Le 25/IV, une expérience analogue fut répétée avec un autre singe (X, *Cercopithec. gr. vir.)* On lui injecte dans la veine de la jambe 120 c. c. de suie en suspension dans une solution de NaCl à 0,6 0/0, et en même temps on lui inocule le sang du singe précédent (IX). Le 5e jour (29/IV), le singe inoculé prit la fièvre récurrente : l'accès dura 4 jours et se termina par une crise (la nuit du 3/V). L'injection de la suie avait donc prolongé l'accès sans modifier son cours habituel.

En résumant ces expériences peu nombreuses, nous pouvons néanmoins conclure que les causes qui altèrent la nutrition cellulaire amènent en même temps la prolongation de la maladie (expérience avec le carmin) et en partie une modification dans son cours. L'introduction de corps étrangers dans les cellules ne supprime pas leur réaction phagocytaire, mais la ralentit plus ou moins; et l'accès, au lieu de se terminer par une crise, peut se terminer par une lyse.

Le manque de singes ne me permit de faire qu'une seule expérience de traitement de la fièvre récurrente.

Un *Macacus rhesus* (XI) fut inoculé le 10/IV avec du sang d'un singe contenant des spirilles.

Le 14/IV, la température du singe inoculé s'éleva à 39°,6 et des spirilles apparurent dans son sang.

On injecta alors à ce singe 6 c. c. de sérum puisé la veille chez le singe malade, 4 heures après la chute de sa température. Le soir du 14/IV, on observait encore des spirilles; mais le lendemain matin (15/IV), ils disparurent, la température baissa et

resta normale jusqu'au 21/IV, quand elle s'éleva brusquement jusqu'à 40°. L'examen du sang, à mon extrême étonnement, démontra la présence de spirilles. Ils y persistèrent jusqu'au soir du 22/IV, c'est-à-dire pendant 36 heures, jusqu'à la chute de la température.

En ce qui concerne le cas exposé, on pourrait supposer ou bien une rechute normale, très rare chez les singes [1], ou bien faudrait admettre que le sérum thérapeutique activa les phagocytes à englober les spirilles, mais qu'ils ne furent pas tous digérés, qu'ils se dégagèrent et provoquèrent une rechute. Si, d'après Gabritchevsky et Ivanoff, on admet l'effet thérapeutique du sérum, il faut accepter la seconde explication.

Alors la brièveté du premier accès et ses températures comparativement basses seraient dues à l'action thérapeutique du sérum ; la rechute serait due à l'action trop faible du sérum, qui n'aurait conféré qu'une immunité très passagère, ainsi que cela a été observé dans d'autres maladies.

CONCLUSIONS

1. Le sang des hommes et des singes ayant supporté la fièvre récurrente présente, dans la majorité des cas, des propriétés spirillicides.

2. Ces propriétés ne sont pas en relation de cause avec la crise, mais elles en résultent plutôt.

3. Le pouvoir spirillicide est dû en partie à l'action réciproque des deux sérums mélangés.

4. Les cellules polynucléaires de la rate contiennent pendant la crise, et quelques heures après, des spirilles vivants et dont la virulence n'est pas atténuée.

5. Les expériences sur les singes prouvent que les spirilles n'ont pas de spores ni pendant ni après la crise.

6. La marche et l'aspect de la maladie sont essentiellement modifiés par l'injection intraveineuse de substances en suspension, injection préalable à l'inoculation du virus.

L'exposé préliminaire de ce travail a été fait au XIIe congrès international à Moscou. M. Gabritchewsky, en l'analysant dans

1. Carter n'en observa que deux fois, et encore admet-il la possibilité d'une contagion par d'autres singes. Dernièrement, Gabritchewsky communiqua un cas de rechute dans ses expériences.

les *Archives russes de pathologie* (1898, t. IV)[1] émet l'opinion que mes expériences faites *in vitro* ne peuvent servir de base à aucune conclusion.

Ce n'est pas parce que je regarde les observations *in vitro* comme concluantes en général que je les fis, mais parce que c'était la seule manière de vérifier celles de M. Gabritchewsky, faites par ce procédé.

M. Gabritchewsky dit plus loin que mes expériences avec l'inoculation de la pulpe de rate, chauffée à 60°, prouvent des choses qui n'ont été niées par personne.

C'est la supposition émise en 1896 par M. Gabritchewsky[2] de l'existence de spores qui a provoqué mes expériences. Si les spores existaient, elles devraient se montrer plus résistantes que l'état végétatif aux diverses influences physiques, chimiques et biologiques. Si mes expériences avaient donné un résultat positif, elles auraient par cela confirmé la supposition de M. Gabritchewsky.

Le résultat négatif prouve, par contre, l'erreur de cette supposition.

Dans son mémoire sur les spirilles des oies, où M. Gabritchewsky abandonne sa théorie des spores, il en expose une autre, dans le but de concilier son hypothèse de la substance spirillicide du plasma sanguin avec les faits observés sur le vivant. Pour appuyer cette nouvelle explication, il cite le fait que la propriété spirillicide du sang est supérieure à celle de l'émulsion des organes.

Mais comme les spirilles vivent dans le sang et la lymphe, et non pas dans les cellules des organes, la comparaison du pouvoir spirillicide du sang avec celui des organes broyés ne présente aucune valeur pour la solution du problème posé. Ceci nous dispense de critiquer avec plus de détails une théorie inventée pour remplacer l'hypothèse de la formation des germes résistants dans l'organisme débarrassé des spirilles.

1. V. aussi *Centralblatt für Bacteriologie* 1898.
2. Ces *Annales* 1896, p. 633 et 637.

TABLEAU I

	Survie des spirilles à 36°,5.	A la température de la chambre.	Dans l'organisme.
A. 24/III. *T*. 40,0 — 2e *jour de la* 3e *rechute.*			
	28 h.	60	40
25/III. 40°,4 — 3e *jour de la* 3e *rechute.*			
	18	22	16
B. 23/III. — *K*. 1er *jour du* 2e *accès.*			
	17		108
24/III. 39°,3 — 2e *jour du* 2e *accès.*			
	27	89	84
+ Mon sang............ (J'ai eu la fièvre récurrente il y a 19 ans).	21	52	
+ A...................	25	86	
25/III. 40°,1 — 3e *jour* 2e *accès.*			
	48	91	60
Mon sang...............	18	57	
A......................	26	95	
26/III. 39°,9 — 4e *jour* 2e *accès.*			
	45	73	36
Mon sang...............	22	60	
A......................	25	63	
C. 9/X. *I*. 39°,8 — 2e *jour* 1er *accès.*			
	21	112	108
+ Sang de K...........	10	95	
+ F...................	23	84	
M......................	12	118	
+ O................... (Fièvre récurrente il y a quatre mois.)	10	62	
D. 22/X. *P*. 32°,1 — 3e *jour* 3e *accès.*			
	27	92	5
+ K...................	18	68	
+ F...................	12	84	
+ O...................	13	61	
E. 12/XI. *G*. 40°,1 — 1er *jour* 2e *accès.*			
	32	84	84
+ Mon sang............	18	70	
+ K...................	15	86	
+ O...................	10	60	
F. 19/XI. *G*. 39°,8 — 2e *jour* 2e *accès.*			
	31	112	60
+ Mon sang............	19	101	
+ Ayant eu la fièvre récurrente...........	21	46	

TABLEAU II

SURVIE DES SPIRILLES

1er *jour de l'apyrexie après le 3e accès*	*à* 36,5	*à* 16,20°
Sérum C + spirilles O................	24	47
A. 2e *jour de l'apyrexie.*		
— C + spirilles Ch..............	23	48
— C + spirilles O	7	28
3e *jour de l'apyrexie.*		
— C + spirilles O	8	24
B. 1er *jour de l'apyrexie après le 3e accès.*		
Sérum A + spirilles D...............	2	12
C. 1er *jour de l'apyrexie après le 4e accès.*		
Sérum C + spirilles U	5	18
D. 1er *jour de l'apyrexie après le 2e accès.*		
Sérum K + spirilles V...............	9	8
2e *jour de l'apyrexie après le 2e accès.*		
— K + spirilles D...............	5	47
E. 3e *jour de l'apyrexie après le 3e accès.*		
Sérum A + spirilles C	5	26
4e jour » »................	7	26
5e jour » »................	7	30
F. 7e *jour de l'apyrexie après le 2e et dernier accès.*		
Sérum O + spirilles Cm..............	1 1/2	8
8e jour » »................	4	8
G. 1er *jour de l'apyrexie après le 1er accès.*		
Sérum R + spirilles Cyt..............	2	16
2e jour » + spirilles Bur..............	2	5
4e jour » + spirilles P................	1 1/2	28
6e jour » + spirilles P................	1	20
H. 8e *jour de l'apyrexie après le 2e et dernier accès.*		
Sérum Chm + spir. Cm	1 3/4	6
9e jour Chm + spir. Cm................	2	4
I. 10e *jour après le 2e et dernier accès.*		
Sérum Kap. + spir. P	36	80
13e jour Kap. + spir. I................	20	28
19e jour Kap. + spir. Rep	10	44
K. 1er *jour après le 3e accès.*		
Sérum Kap. + spir. T................	6	31
2e jour Kap. + spir. F................	10	39

TABLEAU III

		Survie des spirilles à 36,5	Survie des spirilles à 16-20°	Dans l'organisme.
	Macacus nemest. I.			
1.	6 IV. T 40° 8.	57	96	Le singe est tué au début de la crise.
	+ Le sérum d'un cercopith. gris viridis normal.	35	80	
	+ Le sérum du Macacus Rhes. normal.	23	95	
	+ Le sérum du Macacus nemest. normal.			
	Cercopithecus griseo-viridis II.			
2.	2/IV. 40°,6.	40	63	6
	+ Le sérum du Cercop. gris.-viridis normal.	29	58	6
	Macacus Rhesus IV.			
3.	12/IV. 40°,0.	30	81	26
	+ Sérum de II 12 heures après la crise.	18	40	26
	+ Le sang d'un macacus normal.	19	54	26
	13/IV. 49°,9	28	75	2
	+ Le sérum du même singe 4 h. apr. la crise.	21	43	2
	Macacus Rhesus VIII.			
4.	15/IV. 40,4°.	29	57	72
	+ Le sérum du IV.......	47	36	72
	16/IV. 40,9°.............	26	63	60
	+ Le sérum du IV.......	18	40	60
	17/IV. 40,7°.	23	48	36-40
	+ Le sérum du IV.......	15	46	36-40
	18/IV matin. 39,8°........	28	67	12-16
	18/IV soir. 39,0.	16	48	36-40
	+ Sang du III...........	28	64	moins de 12 h.
	+ Sérum du IV.........	20	49	—
	+ Sérum du III.........	18	54	—
	Macacus nemestrinus IX.			
5.	22/IV. 40,1°.	36	80	108
	+ Sérum V, 12 h. après la crise............	23	53	108
	23/IV. 40,0°............	30	78	84
	Sérum V...............	24	48	84
	24/IV. 39,6°............	22	82	60
	+ Sérum V.............	20	40	

Cercopithecus griseo-viridis X.

	Survie des spirilles à 36,5	Survie des spirilles à 16-20°	Dans l'organisme.
6. 29/IV. 40,1°.	39	92	84
+ Le sérum du IX 12 h. après la disparition des spirilles................	48	63	
30/IV. 39,6°..............	25	90	60
+ Le sérum IX 2 h. après la disparition des spirilles..................	16	45	
39,5.....................	30	85	36
+ Sérum IX 36 heures après la crise........	17	63	

I. *Macacus nemestrinus.*

2/IV....	38,1	37,9	
3/IV....	37,6	38,1	
4/IV....	38,2	38,6	
5/IV....	39,0	40,5	spirilles.
6/IV....	40,8	41,2	40,8 sacrifié.

II. *Cercopithec. griseo-viridis.*

Inoculé avec 2 c. c. d'une émulsion de la pulpe de rate au moment du début de la crise.

6/IV....	37,6	38,2		
7.......	38,1	38,4		
8.......	38,1	38,5		
9.......	38,4	38,3		
10.......	39,5	40,1 spiril. à 12 h. 1/2.		
11.......	40,1	40,6	40,0	39,7
12.......	38,1	sacrifié à 12 h.		

après la disparition des spirilles.

III. *Macacus nemest.*

Inoculé de 2 c. c. d'une émulsion de la pulpe de rate, chauffée à 60°.

6/IV........	38,5	38,4
7...........	37,6	38,1
8...........	38,2	38,5
9...........	38,0	38,5
10...........	37,9	38,4
11...........	37,8	38,5
12...........	37,8	38,4
13...........	37,9	38,5
14...........	38,0	38,4
15...........	37,5	38,4
16...........	38,4	38,2
17...........	38,0	38,5
18...........	38,1	38,5

IV. *Macacus Rhesus.*

8/IV....	37,6	38,2	
9.......	37,0	38,4	
10.......	38,0	38,4	
11.......	39,6	39,5	spirilles.
12.......	40,0	40,6	spirilles.
		10 h.	11 h.
13.......	40,9	40,7	40,0 spirilles
	12 h.	1 h.	2 h.
disparus.	38,1	38,0	38,1

Sacrifié 4 h. après la disparition des spirilles.

V. *Cercopithecus griseo-viridis.*

Inoculé d'une émulsion de la rate 4 heures après la crise.

13/IV....		38,2	
14.......	38,1	37,9	
15.......	37,8	38,4	
16.......	38,1	37,8	
17.......	38,9	39,4	spirilles.
18.......	39,9	40,1	spirilles.
19.......	38,0	37,4	
20.......	38,5	38,2	
21.......	37,8	37,5	
22.......	37,6	37,4	
23.......	37,6	38,1	

VI. *Cercopithecus griseo-viridis.*

Inoculé 4 heures après la crise avec une émulsion de rate, chauffée à 58-59°.

13/IV........		38,1
14............	38,1	37,9
15............	37,8	38,5
16............	38,4	38,3
17............	38,1	38,5
18............	38,2	38,7
19............	38,1	38,3
20............	37,9	38,1
21............	37,8	38,3
22............	38,1	38,4
23............	38,2	38,6
24............	38,3	38,2
25............	37,8	38,2
26............	37,9	38,0

VII. *Macacus nemestr.*

Inoculé avec une émulsion de rate 12 heures après la crise.

12/IV........	37,8	38,5
13............	38,1	38,3
14............	38,0	38,2
15............	38,6	38,2
16............	37,5	38,2
17............	38,4	38,1
18............	38,0	38,4
19............	37,6	38,1
20............	38,0	32,2
21............	37,8	37,8
22............	38,0	38,5
23............	38,6	38,9
24............	38,0	38,1

VIII. *Macacus Rhesus.*

Injection de carmin en suspension dans 150 c. c. de Nacl à 0,6 % et inoculation du virus de la fièvre récurrente.

11/IV	37,8	38,9	
12	38,6	39,1	
13	38,0	38,8	
14	39,1	39,2	spirilles.
15	39,5	40,4	—
16	40,9	38,9	—
17	40,7	39,6	—
18	39,8	39,0	—
19	38,5	38,2	
20	37,9	39,0	
21	38,2	38,8	
22	38,1	39,2	
23	37,7	38,1	
24	37,6	37,8	
25	37,8	37,8	
26	37,6	38,0	
27	38,1	38,0	

IX. *Macacus Nemestr.*

Injection de 150 c. c. de suie en suspension et inoculation du virus de la fièvre récurrente en même temps.

18/IV	38,1	38,5	
19	38,0	38,5	
20	38,4	38,1	
21	38,1	38,2	
22	40,1	40,4	spirilles.
23	40,0	40,8	—
24	39,0	40,0	—
25	38,8	39,2	—
26	38,5	38,2	—
27	38,0	37,5	
28	37,6	38,8	
29	37,8	37,5	
30	37,3	38,6	
1/V	39,1	39,0	
2	38,0	37,6	
3	37,4	38,0	
4	37,4	38,0	
5	37,8	38,2	
6	37,6	38,0	
7	37,0	36,9	
8			

X. *Cercopithecus griseo-viridis.*

Injection de 120 c. c. à peu près de suie en suspension et inoculation en même temps du virus de la fièvre récurrente.

25/IV	38,1	38,4	
26	38,0	37,9	
27	37,6	38,2	
28	38,3	38,0	
29	40,1	41,0	spirilles.
30	39,6	39,0	—
1/V	39,5	39,4	—
2	39,6	40,0	—
3	37,0	38,1	
4	37,2	38,0	
5	37,0	38,1	
6	37,2	37,8	
7	37,8	38,5	
8	37,6	38,4	
9	38,3	38,4	
10	38,2	38,5	
11	37,8	37,6	

XI. *Macacus Nemestr. traité.*

10/IV	38,1	38,5	
11	38,1	38,4	
12	37,8	38,6	
13	38,1	37,9	
14	39,6	39,2	spirilles.
15	38,2	37,5	
16	38,6	38,1	
17	37,6	38,0	
18	38,0	38,5	
19	38,0	38,4	
20	37,5	37,8	
21	40,0	39,8	spirilles.
22	40,2	38,4	—
23	37,6	37,2	
24	38,0	38,1	
25	38,2	38,5	
26	37,8	38,0	
27	38,1	38,2	
28	38,2	38,3	
29	38,4	38,1	
30	38,2	38,0	

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LA PNEUMONIE PESTEUSE EXPÉRIMENTALE

PAR M. LE Dr BATZAROFF
MÉDECIN DE L'ARMÉE BULGARE

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Si l'on parcourt l'histoire des épidémies qui ont sévi pendant des siècles, sur différentes parties du vieux monde, et auxquelles on a donné le nom de *peste*, on voit qu'on a signalé les *troubles respiratoires* parmi les symptômes qui accompagnent, très fréquemment, cette maladie. De plus, dans certaines épidémies, et ce sont justement les plus terribles, on trouve les poumons presque exclusivement atteints.

L'épidémie qui a décimé l'Europe et l'Asie sous Marc-Aurèle, celle de 255-265 après Jésus-Christ, dont saint Cyprien nous a donné une fidèle description, la grande peste de Justinien, en 542, et même la terrible *mort noire* ou *peste noire* du XIVe siècle, qui emporta le quart de la population européenne, doivent être rangées dans cette catégorie.

En effet, dans toutes ces épidémies, les cas à *bubons* étaient relativement rares ou faisaient entièrement défaut, ce qui conduisit certains historiens à croire qu'il s'agissait là d'une maladie différente de la peste (on parlait d'une *fièvre maligne épidémique*), car le bubon était toujours considéré comme le symptôme le plus caractéristique de la peste, et même, jusqu'à ces temps derniers, on affirmait qu'*il n'y a pas de peste sans bubon*, d'où le nom courant de la maladie : *peste bubonique*.

Sans qu'on puisse l'établir d'une façon certaine, il est probable, cependant, que les grandes épidémies que nous venons de rappeler étaient des épidémies de peste, mais de peste pulmonaire.

En effet, l'existence d'une forme pneumonique de la peste ne pouvait pas échapper longtemps aux bons observateurs. D'abord, on se mit à parler de *complications pulmonaires*, qui se produisent au cours d'une infection pesteuse et qu'on attribuait généralement à des infections secondaires ; puis, lors de la petite épidémie de Wetljanka, en 1878-1879, le nom *pneumonie épidémique* est déjà prononcé ; mais c'est tout, on ne va pas plus loin ; car malgré toutes les présomptions que, dans certains cas, la maladie peut évoluer dans les poumons, la preuve en était à cette époque impossible.

Ce n'est qu'après la découverte de l'agent morbide de la peste, par MM. *Yersin* et *Kitasato*, que cette preuve a pu être donnée.

En décembre 1896, M. *Childe*, professeur d'anatomie pathologique, à Bombay, en se basant sur l'examen bactériologique des crachats pendant la maladie et sur les résultats recueillis à l'autopsie d'un certain nombre de cadavres pestiférés, a démontré l'existence d'une pneumonie pesteuse primaire.

Deux membres de la mission russe, à Bombay, MM. *Wissokowitz* et *Zabolotny*, ont observé, en 1897, plusieurs cas de pneumonie pesteuse et ont pu produire la maladie expérimentalement chez le singe. Depuis ce temps, le fait constaté par Childe a été confirmé par tous ceux qui ont eu occasion d'étudier la peste sur des malades, lors des dernières épidémies en Asie.

A l'heure actuelle, il est établi d'une façon absolue qu'à côté de la peste bubonique, qui n'est que la forme la plus légère de la peste humaine, il existe une *peste sans bubons*, qui évolue sous forme d'une pneumonie. Très fréquente dans certaines épidémies, moins dans d'autres, la pneumonie pesteuse est une des formes les plus redoutables de la peste. Dès lors, il était indiqué de rechercher expérimentalement par quelles voies le virus pesteux pénètre dans l'organisme, quelle est l'évolution de la maladie et quelles sont les mesures à prendre au point de vue de la prophylaxie ; c'est le sujet de ce travail.

Chez l'animal comme chez l'homme on retrouve deux formes différentes de pneumonie, à savoir la pneumonie pesteuse primaire et la pneumonie pesteuse secondaire. Occupons-nous d'abord de la première.

Comme nous l'avons dit tout à l'heure, bientôt après la constatation de la pneumonie pesteuse chez l'homme par M. Childe, MM. Wyssokowitz et Zabolotny ont essayé avec succès de reproduire la maladie chez le singe, en introduisant la culture du microbe de la peste dans la trachée de l'animal au moyen d'une sonde pendant l'anesthésie chloroformique. Ce procédé, quoique très ingénieux, est peu commode, surtout quand il s'agit de petits animaux comme les rats et les souris ; aussi a-t-on tâché d'en trouver un autre se rapprochant davantage du mode d'infection naturelle.

Si l'on dépose sur la muqueuse nasale d'un animal, et sans l'excorier, un peu de virus pesteux, on lui donne la peste à coup sûr sous forme d'une pneumonie pesteuse[1]. Chez le cobaye, — c'est l'animal dont nous nous sommes servi de préférence pour nos expériences, — comme chez le lapin et le singe, cette petite opération se pratique très facilement au moyen d'une baguette fine, préalablement stérilisée, dont une extrémité est garnie d'ouate pour éviter toute blessure. Mais chez les rats et surtout chez les souris, la chose est plus difficile à réaliser, à cause de l'exiguïté des conduits nasaux : aussi se contente-t-on le plus souvent d'enduire les naseaux avec un peu de virus.

Chez ces petits rongeurs, l'infection ne réussit pas à tout coup comme chez les singes, les lapins, les cobayes ; mais si l'on opère sur une dizaine de souris, par exemple, il y en aura toujours au moins 5 ou 6 qui prendront la maladie et en mourront.

Le virus, introduit dans les narines, consiste en une petite quantité de bacilles pesteux pris sur une culture en gélose, ou en bacilles puisés dans la rate d'un animal pestiféré. La culture en bouillon ne convient pas pour ce genre d'inoculation, car elle est bientôt rejetée au dehors par l'éternuement et la sécrétion légère qui suit l'introduction du virus.

1. Ce fait a été mentionné dans une note préalable de M. le docteur Roux, en octobre 1898. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 665.)

Lorsque le virus est virulent, la maladie présente toujours une marche régulière. Pendant les 12 premières heures, on constate très souvent un abaissement de la température du corps, qui descend parfois jusqu'à 37° et au-dessous : cela est probablement un effet réflexe causé par l'irritation des nerfs sensibles de la muqueuse. Puis la température remonte lentement et se tient dans les limites normales jusque vers la 30me heure après l'inoculation. Pendant ce temps l'animal mange et continue à se bien porter, de façon que rien dans son état général n'accuse la gravité de la maladie dont il est atteint. L'examen bactériologique seul permet à ce moment un diagnostic précoce ; car une trace du mucus nasal, prélevé du côté inoculé, et examiné au microscope, met en évidence une quantité de microbes pesteux en voie de prolifération rapide, marquée par la petitesse des éléments qui forment cette culture.

Mais bientôt le tableau change : la température monte rapidement à 40,5-41°, dans des cas rares même à 42°, et se maintient à ce degré ; en même temps l'animal devient triste, il cesse de manger, son poil est hérissé, sa respiration accélérée. Cet état maladif va en s'aggravant, le dépérissement est rapide, la respiration devient de plus en plus fréquente et pénible ; elle est en même temps stridente, bruyante : on entend un véritable cornage. L'animal commence à tousser et rejette une petite quantité d'un liquide spumeux, rougeâtre. L'écoulement nasal augmente, la matière qui le constitue forme en se desséchant de petites croûtes jaunâtres autour des naseaux. Par le canal naso-lacrymal l'inflammation de la muqueuse nasale s'étend sur la conjonctive, et la conjonctivite qui s'ensuit frappe d'abord l'œil qui correspond au côté de l'inoculation.

L'état fébrile dure en général 24 à 36 heures, puis la température commence à tomber, et le cobaye meurt à la fin de la troisième ou au commencement de la quatrième journée, après avoir présenté une dyspnée énorme et de l'hypothermie. Si la maladie se prolonge, il se produit très souvent une paralysie musculaire de l'estomac et de l'intestin ; l'abdomen est dans ces cas tendu, bombé, et le déplacement du diaphragme vers la cavité thoracique, à la suite de la dilatation énorme de l'estomac, contribue aussi à la suffocation.

A l'autopsie on trouve les glandes lymphatiques augmentées

de volume, et formant des *bubons secondaires;* de temps à autre on constate cependant l'existence de véritables bubons primaires, constitués d'habitude par les ganglions cervicaux profonds. Une seule fois nous avons observé un bubon axillaire du côté de l'inoculation; la tumeur, qui avait la forme et la grandeur d'une fève, était sanguinolente, d'une consistance molle, et contenait une grande quantité de microbes spécifiques.

Quand on ouvre la cavité thoracique, on remarque que les poumons, qui sont fortement dilatés, ne se rétractent point. Dans un certain nombre de cas ils sont très congestionnés, dans d'autres la congestion est moins forte et c'est alors qu'on distingue le mieux les lésions. Ce sont d'abord de petites hémorragies miliaires de la plèvre viscérale, puis des infarctus pulmonaires plus ou moins étendus, des foyers d'infiltration multiples, qui restent parfois limités et disséminés, séparés par la substance normale du poumon, parfois au contraire les foyers voisins se réunissent les uns avec les autres et finissent par occuper un lobe entier. Dans les cas les plus avancés. on constate de vrais foyers d'hépatisation. Toutes ces lésions pulmonaires sont plus prononcées du côté de l'inoculation que du côté opposé lorsqu'il s'agit d'une inoculation unilatérale.

Les deux poumons sont œdémateux. Quand on coupe les parties malades, il s'écoule un liquide sanguinolent contenant des microbes pesteux tantôt à l'état de pureté, tantôt associés à d'autres microbes étrangers. Dans la cavité pleurale et dans le péricarde on trouve souvent une petite quantité d'un exsudat. ou plutôt un transudat séreux, clair, opalescent ou couleur groseille, dans lequel l'examen microscopique et la culture décèlent la présence du bacille pesteux. Le cœur lui-même est fortement dilaté, surtout le cœur droit. L'épicarde présente parfois de petites hémorragies multiples. Ces hémorragies se retrouvent aussi souvent sur la séreuse péritonéale. La cavité abdominale renferme un peu d'exsudat. La rate est grosse, d'une couleur rouge foncé, de consistance moyenne, sa surface granuleuse est couverte d'un grand nombre de petits points blancs. Cette rate *piquetée*, très caractéristique de la maladie, contient une quantité innombrable de bacilles pesteux. L'estomac est, comme nous l'avons déjà dit, très dilaté: dans les cas où sa tunique musculaire a été paralysée, il présente

des petites hémorragies nombreuses, situées surtout sur la grande courbure. Ces hémorragies, qui intéressent la muqueuse stomacale, apparaissent du côté de la séreuse comme de petites taches rondes, régulières, noirâtres, de la grandeur d'une tête d'épingle, entourées d'un cercle de couleur gris sale. La paralysie s'étend ordinairement au duodénum et à la partie adjacente de l'intestin grêle. Le foie est gros et granuleux, le *ductus cysticus* obturé, la vésicule biliaire fortement dilatée. Les reins et les capsules surrénales sont congestionnés, et souvent parsemés de stries et de points hémorragiques.

Le sang du cœur, prélevé aussitôt après la mort et ensemencé, donne une culture pure du bacille de la peste.

A l'examen microscopique des coupes, on constate une congestion générale du tissu pulmonaire, une tuméfaction de la muqueuse des bronches, qui contiennent un exsudat catarrhal. Il existe de nombreux foyers de broncho-pneumonie ; dans ces foyers l'alvéole se présente remplie d'un exsudat composé de cellules des parois alvéolaires desquamées, de leucocytes mononucléaires, de globules rouges et d'un grand nombre de microbes pesteux.

Il résulte de ce court exposé de la marche clinique de la maladie et des lésions, que la *pneumonie qui suit l'introduction du virus pesteux dans le nez d'un animal sensible est tout d'abord une broncho-pneumonie, mais que très vite le virus franchit les poumons, se généralise, et l'animal succombe à une septicémie accompagnée d'un œdème terminal des poumons.*

La mortalité de cette forme de pneumonie chez les animaux est de 100 %.

La pneumonie pesteuse est-elle contagieuse, peut-elle être transmise d'animal à animal par contact ?

Les expériences faites dans ce sens nous permettent de donner une réponse affirmative.

Elles nous ont montré, d'abord, que toutes les sécrétions et excrétions de l'animal malade, surtout le liquide qui s'écoule du nez, celui sécrété par la conjonctive lorsqu'elle est atteinte, la matière rejetée par la bouche à la suite des accès de toux qui précèdent la mort, transportées dans le nez d'un animal sain, lui donnent la maladie. Mais cette dernière est aussi transmissible par simple cohabitation. A plusieurs reprises, nous avons mis des

animaux neufs dans les bocaux où se tenaient les animaux inoculés par le nez; dans la majorité des cas ces animaux ont pris la peste, et, à l'autopsie, les lésions pulmonaires et l'absence de tout bubon primaire prouvaient, d'une façon certaine, que c'est bien par les voies respiratoires que l'infection s'était produite. La contagion se fait plus facilement si les animaux sont nourris avec *des carottes ou des betteraves*, parce que les cobayes sains souillent facilement leurs naseaux en rongeant les aliments entamés par un animal malade.

La quantité de virus qui suffit pour donner la pneumonie pesteuse à un animal sensible est très petite, et il n'est même pas nécessaire que le virus soit virulent pour que l'infection se fasse.

Dans nos vieilles cultures de différentes provenances, nous en avons choisi une dépourvue de toute virulence. Au cours de cette recherche préliminaire, nous avons bientôt constaté que le microbe pesteux n'est pas toujours semblable à lui-même, qu'en d'autres termes il existe différentes variétés de ce microbe. En général, on peut dire que c'est une erreur de considérer le microbe de la peste humaine comme un être très fragile, car s'il existe incontestablement des races qui s'atténuent très vite et meurent en dehors de l'organisme vivant au bout d'un temps relativement court, il en est d'autres qui, dans les mêmes conditions, gardent longtemps leur vitalité, et persistent sur des milieux artificiels pendant des mois et même des années sans subir aucune atténuation notable. Ainsi nous avons vu que certaines de nos cultures, conservées au laboratoire sans précaution aucune, exposées à la lumière du jour pendant trois mois et demi, tuaient les animaux par injection hypodermique avec un léger retard, et, régénérées deux ou trois fois, se montraient presque aussi virulentes qu'elles l'étaient au début. L'atténuation d'une culture pesteuse n'est donc pas toujours facile à obtenir, elle demande beaucoup de temps et le concours de divers artifices.

En octobre dernier, nous avons reçu trois nouveaux échantillons, qui, tout en étant des cultures pesteuses, authentiques par leur origine et leurs caractères morphologiques, avaient perdu complètement leur virulence : c'étaient de vrais saprophytes pour l'organisme de l'animal, car, inoculées à forte dose à des

souris et à des rats, elles les rendaient à peine malades, et les cobayes n'en souffraient pas du tout.

Nous avons introduit dans le nez d'un cobaye un peu d'une de ces cultures d'origine humaine, poussée sur gélose depuis 24 heures. Le premier passage a été pénible, l'incubation a duré 4 jours, et ce n'est qu'au huitième jour que l'animal a succombé à une pneumonie typique. Avec la rate de ce premier cobaye, nous avons inoculé un second, puis un troisième, un quatrième et ainsi de suite; à chaque passage la durée de la maladie diminuait, la période d'incubation devenait moins longue, de façon que, au bout de plusieurs passages successifs, les animaux mouraient aussi vite que lorsqu'ils étaient inoculés avec notre virus virulent ordinaire.

L'inoculation nasale est donc un excellent moyen pour rendre la virulence à un microbe pesteux, qui, à la suite de l'action nocive de divers agents extérieurs, tels que l'influence du milieu où il séjourne, l'oxygène de l'air, la lumière, etc., est devenu tout à fait inoffensif pour l'organisme de l'animal. Lorsque cette atténuation a été poussée très loin, on réussit encore souvent à obtenir ce retour à la virulence, en ayant soin de combiner l'inoculation nasale avec l'association microbienne; parmi les microbes favorisants, il faut citer en premier lieu le streptocoque.

Mais le fait que nous venons de signaler nous paraît important surtout au point de vue de l'épidémiologie de la peste. En effet, M. *Yersin*, bientôt après sa belle découverte du microbe de la peste, en examinant le sol d'une habitation indigène, a trouvé, à une profondeur de 4-5 centimètres, un microbe semblable à celui de la peste, mais qui n'était pas virulent pour les animaux de laboratoire. C'était probablement un microbe pesteux atténué. Après ce que nous venons de constater pour notre microbe quasi-saprophyte, ne peut-on pas admettre que ce virus atténué, déposé dans le sol des pays à peste endémique, puisse à un moment donné, dans de certaines conditions favorables, pénétrer par les naseaux dans l'organisme d'un animal sensible, tel qu'un rat ou une souris, et, après quelques passages successifs, reprendre toute sa virulence? Ce n'est là certes qu'une hypothèse : elle nous paraît très admissible et mérite d'être examinée de près par tous ceux qui ont occasion d'étudier la peste sur place; à cet égard il serait très intéressant de savoir quelles sont les lésions qu'on

observe chez les animaux morts de la peste spontanée, et s'ils présentent toujours le bubon primaire.

De plus, nous avons pu constater que, même à l'état sec, le virus pesteux reste longtemps vivant et virulent. Pour cela, des organes provenant des animaux morts de peste, ainsi que des cultures pesteuses mélangées avec de la terre d'infusoires, sont soumises à la dessiccation dans le vide à la température de la chambre. De temps à autre, on prélève un peu de la substance desséchée, on broie dans un verre stérilisé, et la poudre ainsi obtenue est introduite en petite quantité dans le nez d'un animal. Les résultats de ces expériences, qui sont indiqués dans le tableau ci-joint, nous montrent que le virus pesteux supporte

PNEUMONIE PESTEUSE PRODUITE PAR INOCULATION NASALE DU VIRUS SEC

PULPE SPLÉNIQUE		CULTURE DESSÉCHÉE SUR TERRE D'INFUSOIRES	
DURÉE DE LA DESSICCATION	DURÉE DE LA MALADIE	DURÉE DE LA DESSICCATION	DURÉE DE LA MALADIE
5 jours.	4 jours 1/2	2 jours	7 jours
8 —	4 — —	5 —	6 — 1/2
12 —	4 — 1/2	7 —	Résiste.
14 —	5 — —	19 —	12 jours
20 —	4 — 1/2	37 —	Résiste.
26 —	4 — 1/2		
30 —	6 — 1/2		
33 —	6 — 1/2		
38 —	6 — 1/2		
44 —	Résiste.		

très bien une dessiccation prolongée, lorsqu'il se trouve dans un milieu albumineux, comme la pulpe de la rate, ou de n'importe quel autre organe ; dans ces conditions il ne s'atténue que très lentement, de façon que, dans les premières 3-4 semaines, cette atténuation est insignifiante. Lorsqu'au contraire il n'est pas protégé, comme c'est le cas avec la culture desséchée sur terre d'infusoires, sa virulence baisse rapidement dès les premiers jours, et, au delà de trois semaines, l'inoculation nasale de la culture sèche ne produit plus aucun effet morbide.

En présence de ces faits expérimentaux, il nous semble qu'on a tout le droit d'admettre que les crachats des pestiférés, pneu-

moniques ou autres, les cadavres des animaux morts de la peste, et toute autre substance organique albumineuse renfermant le virus, soit à l'état frais, soit à l'état desséché, jouent un rôle important dans la propagation de la peste humaine en général et de la pneumonie pesteuse en particulier.

La muqueuse nasale n'est pas la seule qui se prête bien à la pénétration du virus pesteux dans l'organisme des animaux. Toutes les muqueuses accessibles jouissent de cette propriété, à un degré plus ou moins considérable. Sans insister davantage sur ce point, très intéressant du reste pour ce qui concerne la pathogénie de la maladie, nous nous bornerons ici à enregistrer le fait, *qu'au point de vue de la facilité de l'infection, les diverses muqueuses peuvent être classées de la façon suivante : muqueuse nasale, conjonctive, muqueuse de la bouche, de l'intestin, du rectum, et en dernier lieu, celle du vagin.* En effet, la maladie provoquée par le dépôt du virus sur la muqueuse vaginale a d'habitude un caractère subaigu : on rencontre même souvent des animaux qui ne prennent pas la maladie par cette voie. Il est fort probable que, dans ces cas, le mucus vaginal ne convenait pas au bacille pesteux : dans le liquide qui s'écoule, on trouve alors quelques microbes de la peste mélangés à beaucoup d'autres espèces.

A chaque muqueuse correspond une forme différente de maladie et une catégorie spéciale de lésions qu'il serait trop long d'énumérer ici. Notons seulement que quand il s'agit d'une peste intestinale[1] contractée à la suite d'injection de substances renfermant des microbes, comme des organes pesteux, par exemple, les ganglions du mésentère, qui représentent les bubons primaires, peuvent atteindre la grosseur d'une noisette. Dans les cas d'infection rectale, on observe de gros bubons inguinaux des deux côtés, et une tuméfaction des ganglions lymphatiques du mésentère ; enfin lorsque c'est le vagin qui est le point de départ de l'infection, on trouve en outre toute une chaînette de ganglions tuméfiés qui remonte le long de la colonne vertébrale. Il est évident que l'inoculation de la peste est un excellent procédé pour étudier la distribution et les anastomoses de nombreux

1. Certains auteurs pensent que les animaux ne peuvent pas être infectés par le tube digestif. Nous avons donné la peste aux cobayes en leur faisant manger un petit morceau de rate pesteuse déposée dans leur bouche, de façon que les narines ne puissent être souillées par le virus et que la muqueuse buccale ne soit pas excoriée.

vaisseaux lymphatiques, ainsi que leurs relations avec les ganglions de la région intéressée.

II

La deuxième forme de l'affection pulmonaire dont il est question, la pneumonie pesteuse secondaire, n'est pas une maladie à part comme la première ; c'est une complication qu'on rencontre surtout chez les animaux atteints de la peste bubonique, mais qui peut se développer aussi bien au cours de toute infection pesteuse, indépendamment de la porte d'entrée, à la condition que l'organisme oppose une certaine résistance au microbe envahisseur. Cette résistance est tantôt naturelle, tantôt acquise à la suite d'introduction dans le corps d'une substance vaccinante, telle que des bacilles chauffés ou du sérum antipesteux, en quantité insuffisante pour rendre l'animal tout à fait réfractaire à la maladie, mais suffisante pour stimuler son système de défense dans la lutte qui s'engage entre lui et l'agent morbide, et reculer de cette façon l'issue fatale.

Ce qui caractérise tout particulièrement la pneumonie pesteuse secondaire, c'est la formation dans les poumons, en nombre plus ou moins considérable, de lésions qui présentent à l'œil une telle ressemblance avec les vrais tubercules, qu'en les voyant pour la première fois on pense avoir affaire à une affection tuberculeuse. Ces *pseudo-tubercules*, car nous allons voir tout à l'heure qu'en dehors de leur forme extérieure ils n'ont rien de commun avec les véritables tubercules, ont leur siège de préférence dans la partie superficielle du poumon. Au début de leur formation, on voit apparaître sous la plèvre viscérale de petits points blanchâtres plus ou moins espacés, entourés d'une zone de réaction rouge foncé, et qui augmentent de plus en plus de volume. Les pseudo-tubercules déjà formés se présentent sous la forme de corps ronds ou un peu allongés, blancs ou de couleur gris sale, dont la surface convexe, proéminente au-dessus du niveau de la plèvre, donne au poumon un aspect granuleux.

Ces formations sont tantôt très nombreuses, parsemées sur toute la surface pulmonaire, et alors elles sont petites comme des grains de mil ou des lentilles, tantôt leur nombre est restreint, mais en revanche elles peuvent atteindre la grandeur d'un petit pois. Dans des cas tout à fait exceptionnels, nous avons observé

de véritables tumeurs grosses comme des noisettes. En outre, il arrive parfois que, par confluence de plusieurs tubercules voisins, toute une partie du poumon subit une transformation en un tissu compact complètement dépourvu d'air, tombant aussitôt au fond de l'eau : on dirait un poumon en état d'hépatisation grise. Au toucher, les pseudo-tubercules donnent la sensation de corps durs. Lorsqu'on coupe en deux un de ces corps, et qu'on l'exprime entre les branches d'une pince, il s'écoule de la surface coupée un liquide trouble, grisâtre, contenant, à côté d'une quantité innombrable de microbes pesteux, un certain nombre de cellules, dont la plupart sont de gros leucocytes mononucléés.

Les poumons porteurs de pseudo-tubercules sont en général volumineux et fortement congestionnés. Sur les coupes microscopiques, colorées à la thionine, on constate que les capillaires sont très dilatés et gorgés de sang, mais que la réaction périvasculaire fait défaut. De petites hémorragies imbibent en différents points la substance pulmonaire. La structure du poumon est dans son ensemble profondément altérée, à tel point que dans certains endroits il est impossible de la reconnaître. Là où elle est encore reconnaissable, on remarque un épaississement énorme des cloisons qui limitent les parois des alvéoles et les lobules pulmonaires, dû à une infiltration leucocytaire très forte. Entre les leucocytes, on voit une grande quantité de microbes pesteux ; parfois, mais rarement, on en trouve aussi à l'intérieur même des leucocytes. Les éléments qui composent cette infiltration sont au début encore assez bien conservés; dans un stade plus avancé des lésions, ces éléments sont détruits et alors on ne voit que de larges traînées d'une masse amorphe, composée de détritus cellulaires. La plupart des alvéoles, également dilatées, sont remplies d'un exsudat formé par des cellules de desquamation des parois des alvéoles, par des leucocytes et des globules rouges ; au milieu de ces éléments, on voit les microbes en quantité plus ou moins grande. Les éléments qui prennent part à la formation de ces exsudats sont dans certains endroits relativement bien conservés, dans d'autres ils sont profondément altérés et en voie de destruction. Alors l'alvéole se présente remplie d'une substance granuleuse, amorphe, parsemée par-ci par-là de petits amas d'une masse chromatique, —

— résidus des noyaux détruits — de quelques éléments cellulaires qu'on peut encore reconnaître malgré l'altération, soit de leur protoplasma, soit de leur noyau, et d'une grande quantité de microbes : ce sont là de véritables foyers de nécrose.

A l'endroit correspondant aux pseudo-tubercules, dont nous avons donné plus haut la description microscopique, la structure pulmonaire est méconnaissable. Situés à la périphérie du poumon sous la plèvre, ces tubercules sont formés d'une agglomération énorme de cellules rondes, surtout de leucocytes mononucléés, dont la plupart présentent des altérations très grandes du protoplasma et du noyau, de quelques résidus du stroma du tissu conjonctif, et d'une véritable culture du microbe de la peste ; le tout est entouré d'une zone de réaction vasculaire très forte, et de petites hémorragies disséminées à la périphérie des pseudo-tubercules.

D'après ce tableau microscopique, on voit que les principaux éléments qui entrent dans la formation d'un tubercule ordinaire, à savoir : la cellule géante et les cellules épithélioïdes, manquent complètement dans ces foyers d'infiltration.

Comme forme pathologique, la pneumonie pesteuse expérimentale secondaire ne ressemble point aux autres formes de pneumonie qu'on est habitué à rencontrer. C'est une pneumonie à part dont nous ferons l'anatomie microscopique dans un travail ultérieur. Ce qu'on peut affirmer dès maintenant avec certitude, c'est que cette pneumonie n'est pas d'origine embolique, mais que c'est le réseau lymphatique du poumon qui en est le point de départ.

La pneumonie pesteuse secondaire, telle que nous venons de la décrire, témoigne d'une résistance de l'organisme de l'animal vis-à-vis du virus, et les pseudo-tubercules sont le résultat d'une défense insuffisante.

Pour la provoquer expérimentalement on a deux moyens à sa disposition : 1° employer un virus atténué; 2° introduire préalablement dans le corps de l'animal et en petite quantité une substance vaccinante.

En effet, lorsque le virus est très actif et que la mort survient dans les 3-4 premiers jours, les poumons ne présentent qu'une simple congestion ; les lésions principales portent sur la rate qui est grosse et couverte de petits points blancs. Si au

contraire on se sert d'un virus qui ne tue l'animal qu'en 7-9 jours, on peut obtenir souvent — ce n'est pas la règle — la formation de pseudo-tubercules typiques dans les poumons; mais dans ces cas-là, les lésions des autres organes subsistent aussi, elles ne sont que plus prononcées. Ainsi les petits points blancs de la rate se sont transformés en petits abcès miliaires, on observe même des abcès pareils à la surface du foie et des reins.

Beaucoup plus sûr et plus commode à manier est le second procédé, c'est-à-dire l'injection d'une substance vaccinante. En faisant l'expérience sur une série d'animaux,et en employant des doses de plus en plus fortes de la matière préservatrice, on réussit facilement à obtenir toute une gamme de lésions, et alors on constate ce fait singulier, qu'au fur et à mesure que les lésions des autres organes diminuent avec l'immunité croissante, celles des poumons augmentent, de sorte qu'à un moment donné, lorsque l'animal se trouve près du point de l'immunité absolue, les lésions pulmonaires sont les seules lésions internes qu'on rencontre à l'autopsie : tous les autres organes, notamment la rate et le foie, gardent leur apparence normale, et le virus pesteux n'existe que dans le poumon et dans les pseudo-tubercules.

La propriété de produire une pneumonie à pseudo-tubercules chez le cobaye, dans les conditions que nous venons d'indiquer, n'appartient pas exclusivement au microbe de la peste. Les mêmes lésions ont été signalées dans certaines maladies septicémiques, entre autres dans celle due au microbe du Hog-Choléra par MM. *Schweinitz*[1] et *Théobald Smith*[2]. C'est un fait de plus qui plaide en faveur de la parenté déjà si frappante de la peste avec les autres septicémies hémorragiques.

Mais les expériences relatées ci-dessus présentent à notre avis un intérêt plus général, notamment au point de vue de l'immunité. Il semble en effet, d'après ces expériences, que chaque organe a son immunité à lui, et que l'immunité générale ou absolue n'est acquise que lorsque tous les organes du corps sont immunisés. A cet égard les différents organes ne se comportent pas de la même façon, car il résulte de nos expériences que la rate et

1. *Medical News*, October 4, 1890.
2. Additional investigations concerning infections swine diseases, *U. S. department of agriculture*, Bulletin n° 6, 1894.

le foie, par exemple, sont les premiers vaccinés contre la peste, tandis que le poumon ne vient qu'en dernier lieu. Quelle est la cause de cette infériorité du poumon? S'agit-il d'une question d'aération qui facilite la culture du microbe? Est-elle due à la pauvreté de cet organe en éléments phagocytaires, ou y a-t-il plusieurs facteurs en jeu? Il est évident que ce sont des questions qui nécessitent pour être résolues des études spéciales et approfondies. Contentons-nous donc pour le moment de signaler le fait, sans chercher à en tirer de conclusions.

III

Après avoir reproduit chez le cobaye les deux formes de la pneumonie pesteuse, nous avons essayé aussi la prévention et le traitement de la pneumonie pesteuse primaire chez cet animal au moyen du sérum antipesteux; mais avant de rapporter les résultats de ces expériences, il nous semble utile de dire quelques mots sur la préparation même du sérum.

La sérothérapie de la peste a été inaugurée, en 1895, lorsque, sous la direction de M. *Roux*, MM. *Yersin*, *Calmette* et *Borrel* ont entrepris l'immunisation des petits animaux de laboratoire en leur injectant d'abord des microbes tués par la chaleur, puis des microbes vivants. Un cheval qui avait reçu des injections ménagées de cultures pesteuses vivantes et virulentes fournit un sérum qui immunisait les souris qui en recevaient 1/10 de cent. cube, 12 heures avant l'injection; à la dose de 1,5 c. c. il guérissait les souris inoculées 12 heures auparavant au moyen d'un fil de platine chargé de virus pesteux. Ce premier sérum appliqué par M. Yersin, en 1896, au traitement d'un certain nombre de cas de peste bubonique à *Canton* et *Amoy*, a donné des résultats excellents.

Malgré son efficacité, cette méthode de préparation du sérum antipesteux par virus vivant présente des dangers. Aussi a-t-on essayé d'immuniser les gros animaux d'une façon moins dangereuse, en leur injectant soit des cultures pesteuses tuées, soit des substances extraites du corps des microbes; ces méthodes ne fournissent pas un sérum aussi actif.

En partant de l'idée que le sérum curatif contre la peste doit être un sérum essentiellement antitoxique, on a voulu imiter le procédé courant pour la préparation des sérums antidiphtérique.

et antitétanique, en employant pour l'immunisation des animaux non plus les corps microbiens, mais les produits solubles élaborés par le microbe lorsqu'il est cultivé dans des milieux liquides; or les tentatives faites dans cette direction n'ont pas abouti à un résultat satisfaisant, peut-être parce que jusqu'à présent on n'a pas réussi à préparer en dehors de l'organisme une toxine suffisamment forte.

C'est M. *Roux* qui a démontré le premier l'existence de produits toxiques solubles dans le milieu liquide qui sert à la culture du microbe de la peste. En se servant d'un virus, dont la virulence était très exaltée par des passages successifs, faits au moyen de petits sacs en collodion introduits dans le péritoine de l'animal, M. Roux a pu obtenir des toxines qui tuaient la souris à la dose de 1/70 c. c. et au delà en moins de 12 heures; mais ces mêmes toxines se montraient peu actives pour les lapins et surtout pour les cobayes. Dans ces temps derniers, M. *Markl* prétend avoir préparé une toxine active pour la souris à la dose de 1/200 c. c., et qui tue le cobaye en 8 jours à la dose de 0,5 — 5 c. c.,sans donner toutefois assez de détails sur le procédé dont il s'est servi pour qu'on puisse reproduire ses expériences; mais M. Markl, lui aussi, a constaté le fait que, même avec une toxine aussi forte que la sienne, on ne peut pas donner aux animaux une immunité active, absolue et durable contre l'inoculation virulente, et qu'on ne peut pas non plus obtenir avec elle un sérum qui réponde à toutes les exigences. En présence de ces faits, il y a lieu de se demander si la toxine qu'on trouve dans le bouillon de culture est le vrai poison pesteux, c'est-à-dire le même que celui que le microbe sécrète dans l'organisme vivant. Ce qui est sûr, c'est que cette toxine ne se forme qu'à basse température, et qu'une fois formée elle est peu stable, car elle se détruit rapidement sous l'influence de la chaleur, de l'oxygène, de l'air et de la lumière.

La *méthode combinée*, sur laquelle compte M. Markl pour avoir un bon sérum antipesteux, et qui consiste dans l'emploi simultané, pour l'immunisation des animaux, et des corps microbiens et de la toxine soluble, n'est pas nouvelle; elle a été essayée à l'Institut Pasteur il y a longtemps, mais on a pu constater que pour la qualité du sérum elle ne présente aucun avantage.

L'immunisation avec des bacilles vivants et virulents est

incontestablement celle qui a donné jusqu'à présent les meilleurs résultats. Elle doit être poursuivie pendant longtemps et appliquée avec prudence; car si l'on va brusquement on risque de perdre les animaux; de plus tous les chevaux immunisés dans les mêmes conditions ne donnent pas un bon sérum, il faut donc opérer toujours sur plusieurs animaux pour pouvoir choisir les meilleurs. Le sérum ainsi obtenu est, comme l'a démontré M. Roux, à la fois anti-infectieux et antitoxique. 1/20 c. c. de ce sérum préserve la souris contre un virus qui tue en 3 jours, et 1/4 c. c. la guérit, lorsqu'il est injecté 12 heures après l'inoculation virulente. Si l'on se sert d'un virus qui tue en 36 heures, les doses de sérum nécessaires pour préserver et pour guérir la souris sont de 1/10 c. c. et 1/2 c. c.

Le cobaye est un animal très sensible à la peste, et il est difficile de le rendre réfractaire à cette maladie; c'est un fait reconnu par tous les expérimentateurs. Néanmoins avec un bon sérum on immunise cet animal contre la maladie, et on arrête celle-ci lorsqu'elle est déjà déclarée. Ainsi 1 c. c. de sérum, mélangé avec une dose sûrement mortelle d'une culture pesteuse, rend cette dernière tout à fait inoffensive pour le cobaye. Le cobaye, qui a reçu 1—2 c. c. de sérum 12 heures avant l'inoculation virulente, ne contracte pas la maladie ; de même on peut guérir un cobaye de la peste si on lui injecte 3—5 c. c. de sérum 24 heures après l'inoculation sous-cutanée du virus. Enfin 3 c. c. de sérum, injectés sous la peau d'un cobaye, le protègent contre l'inoculation intra-péritonéale d'une dose de virus pesteux, qui tue le témoin en 48 heures. Toutes ces expériences ont été faites sur des animaux de 500-700 grammes.

C'est avec ce sérum que nous avons essayé la sérothérapie de la pneumonie pesteuse primaire du cobaye. Les nombreuses expériences faites dans ce but ont montré que 1 c. c. de sérum, injecté 12 heures avant l'infection nasale, suffit pour préserver l'animal lorsque le virus est pris sur une culture en gélose, mais si l'on se sert pour l'inoculation de la pulpe splénique d'un animal pestiféré, la dose de sérum nécessaire pour prévenir la maladie est au minimum 2 c. c.

Les essais pour guérir la pneumonie pesteuse au moyen du sérum antipesteux ont donné des résultats moins favorables, comme cela est indiqué dans le tableau suivant :

INOCULATION NASALE AVEC LA PULPE SPLÉNIQUE		
QUANTITÉ DU SÉRUM INJECTÉ	MOMENT DE L'INTERVENTION	ISSUE DE LA MALADIE
3 c.c.	Aussitôt après l'inoculation.	Guérison.
3 c.c.	1 h. 1/2 — —	Mort en 11 jours 1/2.
3 c.c.	4 heures — —	— 6 jours 1/2.
5 c.c.	7 heures — —	— 9 jours 1/2.
5 c.c.	15 heures — —	— 8 jours 1/2.
5 c.c.	24 heures — —	— 7 jours 1/2.
5 c.c.	40 heures — —	— 5 jours.
Témoin.	— — — —	— 4 jours 1/2.

Ce tableau est très instructif. Il nous montre d'abord qu'avec 3 c. c. de sérum, injectés au moment de l'inoculation, on peut très bien empêcher le développement de la pneumonie, mais que déjà une heure 1/2 plus tard cette même quantité de sérum ne sert qu'à prolonger la maladie. Si l'on veut obtenir cet effet 7 heures après l'inoculation, il faut une quantité de sérum beaucoup plus considérable, et enfin il arrive un moment où, malgré l'injection du sérum, les animaux meurent presqu'en même temps que les témoins.

Il est donc beaucoup plus facile de prévenir la pneumonie pesteuse primaire avec le sérum antipesteux, que de la guérir, et cela s'explique très bien, si l'on se rappelle ce que nous avons dit à propos de la pneumonie pesteuse secondaire, à savoir que, dans le poumon, le microbe de la peste trouve des conditions extrêmement favorables à son développement, et que là il est très peu accessible aux cellules protectrices de l'organisme. Il faut cependant remarquer que, chez beaucoup d'animaux morts malgré l'injection du sérum, on trouve à l'autopsie non pas le microbe de la peste, mais d'autres microbes étrangers : ces animaux ont succombé, par conséquent, à des affections secondaires, dont le terrain a été préparé par l'infection pesteuse primaire.

Le tableau, dont nous venons de parler, amène quelques réflexions d'ordre général. En effet on voit bien qu'il ne suffit pas d'avoir un bon sérum, mais il faut encore savoir s'en servir,

c'est-à-dire l'employer au bon moment. Ceci est surtout important lorsqu'on a affaire à une maladie septicémique, comme la peste, où il faut compter avec la multiplication rapide et énorme du microbe. C'est un fait bien établi à présent que le sérum n'agit pas par lui-même — le bacille pousse bien dans le sérum spécifique — mais par l'intermédiaire de certaines cellules de l'organisme, dont il excite l'action : or le nombre de ces cellules est toujours restreint, tandis que celui du microbe, qui se multiplie selon les règles de la progression géométrique, augmente dans des proportions fantastiques, de sorte qu'à partir d'un certain moment toute intervention devient illusoire. Dans la pratique on ne tient pas généralement compte de ce fait, et on exige souvent du sérum ce qu'il ne peut pas donner.

Pour ce qui concerne spécialement la peste, il faudrait toujours porter son attention sur la forme de la maladie et le temps qui s'est écoulé depuis le moment de l'infection jusqu'à l'application du sérum. La pneumonie pesteuse primaire, par exemple, est une forme de la peste qui sera difficile à guérir avec le sérum antipesteux : c'est ce qui ressort de nos expériences.

CONCLUSIONS

I. L'animal peut contracter les deux formes de la pneumonie pesteuse qu'on observe chez l'homme, à savoir la pneumonie pesteuse primaire et la pneumonie pesteuse secondaire.

II. La pneumonie pesteuse expérimentale primaire est une broncho-pneumonie lobulaire ou confluente, qui aboutit généralement à une septicémie. On peut la provoquer chez tous les animaux de laboratoire, en déposant sur leur muqueuse nasale et sans l'excorier, un peu de virus pesteux pris sur une culture en gélose, ou mieux encore, dans la rate d'un animal pestiféré.

III. La pneumonie pesteuse est transmissible d'animal à animal par contact. Les sécrétions de l'animal malade, notamment les larmes, le mucus nasal et bronchique, transportées dans le nez d'un animal sain, lui confèrent la maladie.

IV. Un virus pesteux, qui ne tue plus par inoculation hypodermique, donne la pneumonie à l'animal lorsqu'il est introduit dans ses voies respiratoires ; après plusieurs passages successifs par le nez, ce virus atténué finit par reprendre sa virulence.

V. Le virus pesteux desséché avec des matières albumineuses

est capable de provoquer chez l'animal, par inoculation nasale, une pneumonie pesteuse, même après plusieurs semaines de dessiccation.

VI. La pneumonie pesteuse secondaire se développe chez le cobaye au cours de toute infection pesteuse, indépendamment de la porte d'entrée, à la suite d'une résistance naturelle ou acquise de l'animal vis-à-vis du virus. Comme forme anatomique, c'est une pneumonie particulière qui conduit à la formation de pseudo-tubercules à la surface du poumon.

VII. Avec le sérum antipesteux, on peut très bien prévenir la pneumonie pesteuse primaire de l'animal, mais il est difficile de la guérir lorsqu'elle est déclarée.

VIII. Toutes les muqueuses accessibles de l'animal se prêtent, plus ou moins bien, à la pénétration du virus pesteux. Selon le degré de leur sensibilité, on peut les classer de la façon suivante : muqueuse nasale, conjonctive, muqueuse de la bouche, de l'intestin, du rectum et en dernier lieu la muqueuse du vagin.

Envoyé par le Gouvernement Bulgare pour étudier la peste et la préparation du sérum antipesteux, j'ai trouvé la plus large hospitalité à l'Institut Pasteur, où tous les moyens de travail ont été mis à ma disposition. C'est pour moi un devoir des plus agréables d'exprimer ici ma reconnaissance aux chefs de cet Institut, MM. Duclaux, Metchnikoff et Roux, et surtout à ce dernier.

BIBLIOGRAPHIE

1. Netter. La Peste et son microbe. *La Semaine médicale*, 1895, nº 9.

2. Yersin. La Peste bubonique à Hong-Kong. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1894, p. 662.

3. Yersin, Calmette et Borrel. La Peste bubonique. Deuxième note. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1895, p. 589.

4. Roux. Sur la Peste bubonique et son traitement par le sérum antipesteux. *La Semaine médicale*, 1897, p. 27.

5. Yersin. Sur la Peste bubonique. Sérothérapie. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1897, p. 81.

6. De Giaxa e Gosio. Richerche sul bacillo della peste bubbonica in rapporto alla profilassi. *Ref. Centralbl. f. Bacteriol.*, 1897, nº 13.

7. Gabritschewsky. Zur Biologie des Pestbacillus. *Russ. Arch. f. path.-Klin. Med. u. Bacteriol.*, 1897, Bd. III, nº 4.

8. Childe. Remarks on the occurrence of plague pneumonia. *British med. Journal*, 1897, p. 1215.

9. Metchnikoff. Sur la Peste bubonique. Communication au Congrès de Moscou. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1897, p. 736.

10. Zabolotny et Wyssokowitz. Recherches sur la Peste bubonique. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1897, p. 663.

11. Sticker. Ueber die Pest nach Erfahrungen in Bombay. *Münch. med. Wochenschr.*, 1898, nº 1.

12. Gabritschewsky. Ueber die Gewinnung des Pestserums. *Russ. Arch. f. path.-klin. Med. u. Bacteriol.*, 1897.

13. Wernicke. Ueber Immunisirugsversuche bei der Bubonenpest. Ref. *Centralbl. f. Bacteriol.*, 1898, nº 22.

14. Wladimiroff. Zur Technik der Pestserumbereitung. *Wratsch*, 1897, nº 16.

15. Dieudonné. Ueber die Resultate der *Yersin*'schen und *Haffkine*'schen Immunisierungs und Heilungsversuche bei Pest. *Münch. med. Wochenschr.*, 1898, nº 6.

16. Mitteilungen der deutschen Pestkommission in Bombay. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1897, nºs 17, 19, 31, 32.

17. Lustig und Galeotti. Versuche mit Pestschutzimpfungen bei Thieren. — Schutzimpfungen gegen Beulenpest. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1897, nºs 15, 19.

17. Kolle. Zur Bakteriologie der Beulenpest. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1897, nº 10.

18. Abel. Zur Kenntniss des Pestbacillus. *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1897, nº 13.

19. Wilm. Ueber die Pestepidemie in Hong-Kong im Jahre 1896. *Hyg. Rundschau*, 1897, nºs 5, 6.

20. Gladin. Die Lebensfähigkeit der Pestbacillen unter verschiedenen physikalischen Bedingungen. Ref. *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1898, nº 15.

21. Bandi und Stagnitta Balestieri. Die Verbreitung der Bubonenpest durch den Verdauungsweg. *Zeitsch. f. Hyg.*, 1898. Bd. XXVIII, p. 26.

22. Markl. Beitrag zur Kenntniss der Pesttoxine. *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1898, nºs 18, 20.

23. Simond. La propagation de la Peste. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1898, nº 10.

24. Hankin. La propagation de la Peste. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1898, nº 11.

25. Ueber die Beulenpest in Bombay im Jahre 1897. *Gesammtbericht der Akad. d. Wissensch. in Wien Kommission.* Wien, 1898.

ÉTUDES
SUR L'IMMUNISATION CONTRE LE SÉRUM D'ANGUILLES

Par M. le Dr TH. TCHISTOVITCH

(Travail des laboratoires de MM. Metchnikoff et Roux.)

La question de l'immunité active contre les microbes peut être considérée pour le moment comme résolue par la théorie de la phagocytose. Il y a un autre problème beaucoup plus difficile et plus compliqué, c'est celui de l'immunité contre les toxines. Depuis deux ou trois ans seulement, les travaux de Metchnikoff et ses élèves, de Ehrlich et Wassermann, en ont commencé l'étude.

En 1897, M. Ehrlich [1] démontra qu'on peut *in vitro* paralyser l'action coagulante de la ricine sur le sang de lapin en la mélangeant avec le sérum antitoxique de chèvre immunisée contre la ricine. Cette expérience était autant plus précieuse qu'elle prouva pour la première fois qu'il est possible d'étudier l'immunité contre les toxines en dehors de l'organisme.

M. H. Kossel [2] publia bientôt un fait analogue et encore plus intéressant, concernant une autre substance toxique : le sérum d'anguille, qui dissout *in vitro* très facilement les hématies de lapin, peut être rendu tout à fait inoffensif, si on lui ajoute du sérum antitoxique. Cependant, à côté de cela, M. Kossel observa que les globules rouges des lapins immunisés contre le sérum d'anguille ne se dissolvaient plus, et cette résistance croissait avec le degré d'immunisation de l'animal. Cette dernière découverte de Kossel a été confirmée dans ces derniers temps par MM. Camus et Gley [3]. Nous avons essayé d'ajouter quelques faits aux travaux de nos devanciers sur ce point.

1. Zur Kenntniss der Antitoxinwirkung. *Fortschritte d. Medicin*, n° 2, 1897.

2. Zur Kenntiss der Antitoxinwirkung. *Berliner Klin. Woch.*, n° 7, 1898.

3. Recherches sur l'action physiologique du sérum d'anguille. Contribution à l'étude de l'immunité naturelle et acquise. *Arch. internat. de pharmacodynamie*. V, t. III et IV, 1898.

De tous les animaux de laboratoire, les lapins sont les plus aptes à l'immunisation : ils la supportent très facilement et donnent une antitoxine assez forte après un laps de temps très court. C'est pourquoi nous nous en sommes servi principalement. Nous les avons immunisés en leur injectant des doses croissantes de sérum d'anguille frais dans les veines ou sous la peau, en partant de 0,05-0,1 c. c. ; si le lapin supportait bien cette première injection et reprenait son poids primitif, il supportait ordinairement très bien les suivantes.

Il est plus difficile d'immuniser les cobayes. Nous avons perdu beaucoup d'animaux et n'en avons conservé que deux suffisamment immunisés ; mais la quantité de sérum qu'ils purent nous fournir était insuffisante pour nos expériences.

Les chiens supportent bien les injections de sérum d'anguille et donnent de l'antitoxine, mais pas assez forte.

Une chèvre, qui n'avait reçu que 3,15 c. c. de sérum d'anguille sous la peau, a donné une excellente antitoxine, plus forte que beaucoup d'autres provenant de lapins et de chiens. Malheureusement l'immunisation de cette chèvre a été entreprise trop tard et nous n'avons pas pu employer son antitoxine dans nos recherches.

Les poules, qui sont insensibles au sérum d'anguille, ne donnent pas de véritable antitoxine après des injections répétées dans le péritoine ; cependant il paraît que le sérum des poules ainsi traitées peut à fortes doses empêcher *in vitro* la dissolution des globules rouges du lapin [1].

Les pigeons meurent très facilement d'une injection de 0,1 c. c. de sérum d'anguille dans le péritoine, quoique leurs globules rouges soient presque insolubles ; après des injections répétées de petites doses croissantes sous la peau, le sang des pigeons acquiert des propriétés antitoxiques très faibles (contre la dissolution des globules de lapin *in vitro*).

Après ces courtes observations préalables, occupons-nous de l'antitoxine des lapins.

Il suffit d'injecter 2 à 4 fois de petites doses de sérum d'anguille pour provoquer dans le sang des lapins des propriétés antitoxiques. Ordinairement la force de cette antitoxine n'est

1. Ces expériences ont été faites avec le sérum chauffé à 55°, comme toutes les fois qu'il s'agissait d'étudier l'action antidissolvante d'un sérum d'une autre espèce animale.

pas grande, et pour neutraliser la toxicité d'une partie de sérum d'anguille, il en faut 10-15-20 parties (la chèvre fournit une antitoxine d'une valeur de 10 pour 1). Le résultat obtenu sur un grand nombre de lapins soumis à l'immunisation était toujours le même, l'antitoxine apparaissait régulièrement et avait à peu près la même valeur.

Nous employions pour l'examen de l'antitoxicité les deux procédés suivants : dans de petits tubes à essai nous mettions 5 gouttes d'une solution de 10 0/0 de sérum d'anguille dans de l'eau physiologique, ce qui équivaut à 1/2 goutte de sérum entier, et des quantités croissantes d'antitoxine, à partir de 3 gouttes ; puis nous ajoutions dans chaque tube 1 ou 2 c. c. de sang de lapin (normal) dilué au 20e avec une solution de chlorure de sodium à 7 °/$_{00}$. Le tube contenant la quantité minimum d'antitoxine et ne présentant aucune diffusion de l'hémoglobine dans le liquide nous indiquait la valeur antitoxique du sérum éprouvé (contre l'action dissolvante sur le sang de lapin).

D'un autre côté, nous injections dans les veines, à plusieurs lapins, de fortes doses de toxine mélangée avec diverses quantités de la même antitoxine. Les deux résultats concordaient ordinairement plus ou moins, ou bien différaient un peu.

Voulant augmenter la propriété antitoxique, nous nous sommes mis à injecter à une série de lapins des doses croissantes dans les veines ou sous la peau, et nous avons réussi à leur faire supporter des quantités de toxine plusieurs fois mortelles. En éprouvant de temps en temps l'antitoxine de ces lapins, nous avons constaté un fait très inattendu : l'antitoxicité baissait progressivement au cours de l'immunisation, malgré que les doses injectées augmentaient ; les conditions dans lesquelles on prélevait le sang restaient toujours les mêmes, et le poids des lapins indiquait leur état de santé et de vigueur complète. Dans toutes nos expériences il n'y a pas eu une seule exception sur ce point [1] : l'antitoxine, plus ou moins forte dès le début de l'immunisation, s'affaiblissait au fur et à mesure qu'on poussait celle-ci plus avant, et chez les lapins qui avaient reçu les quantités maxima de toxine et qui supportaient très bien des doses

1. Le seul cas qu'on nous pourrait objecter et le lapin XI, qui, à la dernière prise de sang, faite à cause de sa mort imminente, nous fournit une augmentation de valeur de son antitoxine, surtout *in vitro*.

dépassant de beaucoup la dose mortelle en quelques minutes, l'antitoxine descendait jusqu'à un niveau si bas qu'elle pouvait à peine être démontrée par l'expérience. Pour en donner des exemples, il suffit d'un côté de citer les expériences avec les lapins XI, XII, XVII et XVIII, où cet abaissement d'antitoxicité pendant le cours de l'immunisation a été observé directement, et de l'autre de comparer les chiffres de la valeur des sérums obtenus après une immunisation forte et prolongée (lapins IV, XIII et XIV) avec ceux qui correspondent à l'immunisation à peine commencée (lapins II, V, VI, VII, VIII, IX).

La présence dans le sang des lapins d'une antitoxine plus ou moins forte ne peut donc pas servir de critérium du degré de leur immunisation contre le sérum d'anguille. Il est évident que la réaction initiale de l'organisme à l'introduction de la toxine cède dans ce cas la place à un autre mécanisme; celui-ci détruit la toxine aussi bien, ou même avec plus de perfection, mais il n'est pas accompagné par la production de l'antitoxine.

Admettons pour un instant que la destruction de la toxine se produise par une digestion intracellulaire, ressemblant à la digestion de l'albumine par le suc pancréatique : au commencement elle n'est pas parfaite et aboutit à la formation d'antitoxine, comme l'albumine aboutit à l'albumose dans le cas de la trypsine; alors l'antitoxine est rejetée dans le sang. Mais au fur et à mesure que les cellules s'habituent à cette digestion un peu nouvelle et se perfectionnent dans leur besogne, la destruction va plus loin, jusqu'à la peptone dans notre exemple, ou bien elle amène la décomposition complète de la toxine.

Cette interprétation des faits observés est encore bien loin de la certitude, mais s'appuie néanmoins sur quelques observations.

Nous avons vu plus haut la preuve faite par M. Kossel, que les globules rouges des lapins immunisés contre le sérum d'anguille deviennent moins solubles dans ce sérum, et cela à un degré qui correspond au degré d'immunisation. Ce fait a été confirmé par Camus et Gley sans réserve. Nous nous sommes occupés de la même question avec cette seule différence, qu'en même temps que nous établissions la solubilité des hématies d'un lapin immunisé, nous éprouvions le degré d'antitoxicité de son sérum. Sur 50 c. c. de sang prélevé dans une artère, nous en

défibrinions une partie (10 c. c.); le reste servait à préparer le sérum après coagulation. Le sang défibriné était soumis à la centrifugation pour séparer les globules du sérum ; nous enlevions ce dernier, et pour éloigner les derniers restes de l'antitoxine, nous délayions de nouveau les globules dans du sérum normal, après quoi le mélange était centrifugé encore une fois. Par ce procédé nous obtenions les globules débarrassés de sérum antitoxique. Ayant fait avec ces globules un mélange au 20e dans une solution à 7 0/00 de NaCl (cette solution est fortement hyperisotonique), nous le répartissions dans une série de tubes par volumes de 1 c. c., auxquels nous ajoutions différentes quantités de sérum d'anguille ; comme témoin nous nous servions du sang d'un lapin normal, prélevé et traité chaque fois dans les mêmes conditions. D'un autre côté nous avons toujours établi la valeur antitoxique correspondante par les procédés déjà décrits.

Nous avons fait ainsi 17 épreuves de solubilité, dans le sérum d'anguille, des globules rouges de lapins immunisés : 9 nous ont présenté une augmentation de résistance plus ou moins grande, comme on peut le voir dans la table (cas IV, VII, VIII, IX″, XI″, XII, XII″, XIV, XVIII, XVIII et XVIII″). Par contre, les autres 8 expériences (plutôt 7, parce que dans le cas X les doses de toxine ont été trop fortes) ne présentèrent aucune augmentation de résistance (cas VIII, X, XI, XI, XIII, XIII′, XVII, XVII″).

En analysant de plus près ces expériences, nous remarquons d'abord que cette augmentation de résistance apparaît souvent au moment où l'immunisation est déjà poussée jusqu'à un degré plus ou moins élevé (VII′, VIII′ et XI″). Ensuite il devient évident que la diminution de solubilité n'est pas en relation avec la quantité de l'antitoxine dans le sang ; d'ailleurs, l'antitoxine dissoute ne pouvait jouer aucun rôle dans la résistance des hématies, parce qu'elles étaient soigneusement lavées ; et si nous examinons attentivement la table, nous verrons que l'augmentation de résistance s'observait justement dans les cas où l'antitoxine était plus faible, où il y en avait moins (XII, surtout XII″, XVIII′ et XVIII″) ; par contre, dans les cas X, XI, et surtout VIII, l'antitoxine était très forte, tandis que la solubilité des globules rouges, non seulement n'était pas inférieure à la normale, mais la dépassait même dans le cas VIII.

Ainsi nous pouvons considérer les observations de M. Kossel en général comme tout à fait justes : il se passe pendant l'immunisation contre le sérum d'anguille certaines modifications dans les globules rouges, qui ont pour conséquence un surcroît de stabilité ; cependant il faut ajouter que les modifications dont il est question ne sont nullement parallèles à l'antitoxicité du sang ; loin de là, elles la remplacent au moment où l'antitoxicité au cours de l'immunisation baisse en cédant la place à une immunité pour ainsi dire « cellulaire ».

Mais comment s'expliquer cette circonstance dans l'augmentation de résistance des globules rouges ? Pourquoi l'immunisation peut-elle s'observer, sans que les globules rouges se modifient ? L'explication est probablement la suivante : la propriété de dissoudre les globules du lapin et d'autres animaux n'est peut-être pas le trait principal, essentiel du sérum d'anguille ; il suffit de le chauffer à 55° pendant une demi-heure pour le priver complètement de cette propriété globulicide, en laissant intacte sa toxicité pour les lapins, comme nos expériences nous l'ont démontré. Il y a des raisons de croire que la propriété globulicide est commune à beaucoup, sinon à tous les sérums vis-à-vis des globules d'autres espèces animales, mais qu'elle est seulement exaltée dans le sang d'anguille ; nous trouvons dans divers autres sérums toute une série de pouvoirs globulicides, depuis le sérum de cobaye, inactif pour le lapin, jusqu'à celui de l'anguille, en passant par le chien et la poule, dont le sérum est déjà très actif (J. Bordet). En faveur de cette conception plaide aussi l'unité de température (55°), à laquelle est détruit le pouvoir globulicide et bactéricide de tous les sérums, quel que soit l'animal qui le fournit, tandis que les autres propriétés, agglutinante ou préventive, par exemple, restent intactes. D'un autre côté, nos expériences d'immunisation avec le sérum d'anguille chauffé à 55° nous démontrent : 1° que sa toxicité n'est pas diminuée par ce chauffage, et 2° que les propriétés de l'antitoxine obtenue de cette façon ne se distinguent en aucun point de celles de l'antitoxine ordinaire ; en d'autres termes, en éliminant la propriété globulicide de la toxine, nous ne changeons point le caractère de réaction de l'organisme, qui a pour conséquence la production de l'antitoxine.

Tous ces faits forcent à admettre que le côté essentiel de

l'action du sérum d'anguille sur l'organisme n'est pas du tout dans la dissolution des globules rouges, et que, par conséquent, ce ne sont pas eux qui sont attaqués par la toxine en premier lieu; il y a probablement d'autres cellules auxquelles incombe la tâche de la détruire et qui sont étroitement liées à la production de l'antitoxine; ce sont elles qui doivent présenter par excellence des altérations de résistance et de sensibilité au poison. Parmi ces cellules, les leucocytes sont, à ce qu'il paraît, appelés à jouer un rôle très important; on est amené à cette conclusion par la comparaison avec leur attitude vis-à-vis d'autres intoxications bactériennes et minérales.

D'abord M. Metchnikoff [1] a fourni la preuve que chez la poule la toxine tétanique est fixée par les leucocytes (et les cellules génitales); la plus grande partie de l'antitoxine se trouve aussi dans les exsudats riches en leucocytes. L'injection de la toxine tétanique est suivie d'une augmentation du nombre des leucocytes dans le sang, non seulement chez les animaux réfractaires, comme la poule, mais même chez les plus sensibles, à la condition que la dose ne soit pas trop grande. En répétant les expériences bien connues de M. Wassermann, M. Metchnikoff a démontré que la substance cérébrale chargée de toxine tétanique est englobée par les phagocytes macrophages dans la cavité péritonéale et sous la peau, et reste dans leur intérieur jusqu'à digestion complète.

Les recherches de M. Stoudensky (ces *Annales*, p. 126) confirment entièrement cette observation pour une autre substance capable de fixer la toxine, le carmin. Enfin, le travail de M. Besredka [2] prouve d'une façon indiscutable que l'arsenic injecté aux animaux est englobé par les leucocytes, le sérum de ces animaux immunisés est antitoxique, et cette antitoxine contient aussi des combinaisons arsénicales.

Nous avons observé nous-même une réaction leucocytaire considérable après l'injection de doses non sûrement mortelles aux lapins, notamment une hyperleucocytose ou bien une faible hypoleucocytose chez les lapins immunisés, dans les premiers moments après l'injection. Malheureusement ces expériences, qui

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, n° 1, 1899.
2. Recherches sur l'influence de l'organisme sur les toxines. Deuxième et troisième mémoires. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899.

concernent la résistance des leucocytes vis-à-vis du sérum d'anguille, sont tout à fait insuffisantes pour qu'on puisse en tirer des conclusions solides, et cette question exige une étude plus approfondie.

Nous passons à présent à un autre fait observé pendant l'immunisation, et qui trouve sa confirmation dans les intéressantes études de M. Bordet.

Si l'on mélange dans un tube stérile du sérum d'anguille dilué avec un sérum antitoxique de lapin, de cobaye, de chien ou de chèvre, on voit, déjà après quelques instants, le liquide se troubler: d'abord il devient opalescent, puis le trouble est tout à fait manifeste, et enfin on distingue, dans le liquide, de petits flocons qui tombent peu à peu au fond et laissent surnager une couche parfaitement transparente. Les sérums des animaux non immunisés ne donnent ni trouble ni précipité. Dans certains cas (si l'antitoxine est faible), il ne se fait pas de précipité, mais le liquide reste légèrement troublé. En observant la formation du précipité en goutte pendante au microscope, on remarque de toutes petites granulations qui se réunissent en amas, et qui ressemblent beaucoup aux amas de microbes agglutinés. S'il y a des globules rouges dans la goutte, on peut facilement constater qu'ils sont entraînés et retenus dans les mailles de ce précipité granuleux.

Le précipité se dissout facilement dans les alcalis et les acides dilués, reste insoluble dans l'eau, les solutions de sels neutres et des carbonates alcalins. Si nous prenons plusieurs tubes contenant de la toxine et des quantités variables d'un acide quelconque, nous verrons le précipité se former là seulement où la réaction du mélange reste alcaline ; si elle est neutre, il n'y a qu'une opalescence dans le liquide; la réaction acide empêche même la formation de cette dernière.

Le précipité débarrassé de la partie liquide surnageante est parfaitement inoffensif pour le lapin en injection intra-veineuse; les propriétés du liquide surnageant dépendent entièrement des quantités réciproques des deux substances mélangées, de la toxine et de l'antitoxine.

En nous arrêtant un peu sur l'analyse des conditions favorisant la formation de ce précipité, nous avons remarqué qu'on l'observait le mieux dans les cas où l'antitoxine était assez forte,

c'est-à-dire où l'immunisation était récente, de courte durée; il suffit de consulter la table pour en avoir la certitude (cas II, III, V, VIII, X, XI, cob. A, chien II, chèvre). Par contre, plus l'antitoxine est faible, plus l'immunisation est poussée avant, moins est prononcé le trouble, ou bien il ne s'observe plus du tout. Nous étions déjà près d'admettre un parallélisme complet entre la valeur de l'antitoxine et le volume précipité, lorsque nous avons vu quelques exceptions à cette régularité (par exemple dans le cas VII, le précipité était très médiocre, tandis que l'antitoxine était très forte; le chien I, III, IV, le lapin XII, tous avec une antitoxine plus ou moins forte, ne donnèrent pas de précipitation de la toxine); néanmoins, même si la formation du précipité n'est pas liée étroitement avec l'antitoxicité, nous pouvons dire que la fabrication de l'antitoxine est ordinairement suivie de l'apparition dans le sang de certains corps capables de donner avec la toxine une précipitation, une coagulation.

M. Kraus[1] fut le premier qui observa un fait semblable dans ses expériences avec les cultures filtrées ou exprimées de bacille typhique, pesteux, et du vibrion cholérique. M. Nicolle[2] confirma ce fait pour le *bact. coli*, et attribua une importance particulière à la substance agglutinée, qui se trouve dans les corps des microbes jeunes et qui diffuse dans le milieu liquide ambiant dans les cultures vieilles. M. Nicolle pense que la coagulation de cette substance est la cause de l'agglutination des microbes, dont les corps jouent dans le phénomène un rôle passif et ne sont qu'entraînés dans le coagulum. M. Marmorek a pu constater aussi la formation de précipités dans les cultures filtrées de streptocoques sous l'action du sérum antistreptococcique. Nous allons voir bientôt qu'il faut distinguer dans notre cas la coagulation (précipitation) de la vraie agglutination.

Les essais de chauffage du sérum antitoxique à diverses températures ont montré que la propriété coagulante ne disparait pas à une température fixe, mais baisse peu à peu à partir de 60° et se détruit au-dessus de 70°.

Le chauffage du sérum d'anguille jusqu'à 58° diminue déjà la

1. Ueber specifische Reactionen in Keimfreien Filtraten aus Choléra, Typhus Pest bouillon culturen, erzeugt durch homologes Sérum. *Wiener klin. Woch.* N° 32, 1897.

2. Recherches sur la substance agglutinée. *Annales Pasteur*, 1898, p. 161.

quantité du précipité, tandis que, chauffé à 80° environ, ce sérum ne donne plus de précipité du tout.

Voulant nous rendre compte du phénomène de précipitation et étudier les conditions qui la provoquent, nous avons entrepris une série d'expériences en injectant dans le sang des lapins d'autres substances se rapprochant plus ou moins du sérum d'anguille, notamment du sérum de cheval et de la peptone, dont l'action physiologique sur la coagulation du sang, d'après les expériences de M. Delezenne[1] et d'autres, ressemble à celle du sérum d'anguille. Après 5-6 injections (par 3 c. c. de sérum de cheval et 5 c. c. de solution de peptone à 10 0/0 à la fois), nous avons prélevé le sang de ces animaux. Le sérum des premiers (au sérum du cheval) ne donne de précipité ni avec le sérum d'âne, ni avec le sérum normal de lapin, tandis qu'il présente une précipitation abondante avec le sérum de cheval, tout à fait analogue à celle que nous avions vu en mélangeant la toxine d'anguille avec l'antitoxine. Par contre, le sérum des lapins à la peptone ne donnait de précipité ni avec des sérums différents, ni avec la solution de peptone. M. Bordet a eu l'occasion de confirmer la formation de précipité dans le sérum de poule mélangé avec le sérum de lapin traité par des injections du sang de poule.

On voit par là que le phénomène décrit est assez général; il est en même temps spécifique, ne s'observant qu'en cas de réaction entre un sérum et son « antisérum ». Il est tout naturel de croire qu'en injectant dans le sang d'un animal donné du sang ou du sérum d'une autre espèce, nous provoquons des altérations dans son organisme, qui consistent dans l'apparition de nouvelles substances moins offensives.

La formation de ces anticorps s'observe dans le cas où les éléments étrangers, introduits dans le corps, sont capables de provoquer une certaine réaction du côté des cellules de l'organisme; à cette catégorie appartient le sérum d'anguille, de poule (pour le lapin et le cobaye) et même de cheval, puisque pour les lapins les injections successives de ce sérum dans les veines ne sont pas indifférentes; ils peuvent en mourir, si la quantité injectée est considérable. Dans le cas où la matière

1. Nouvelles recherches sur le mécanisme d'action des agents anticoagulants du groupe de la peptone. *Travaux de physiologie de Montpellier*, 1898, p. 284.

injectée ne provoque pas de réaction du côté de l'organisme, il n'apparaît dans le sang rien de semblable à ces anticorps, capables de coaguler le sérum étranger; tel est le cas pour une observation faite par M. Bordet et qu'il a bien voulu nous communiquer verbalement : le sérum du cobaye qui a reçu du sang de lapin ne donne pas de précipité avec le sérum de ce dernier.

Nous avons déjà dit plus haut que la formation de précipités doit être bien distinguée de la neutralisation de la toxine par l'antitoxine ; mais il est évident que ce précipité, se formant au dépens de substances qui se trouvent à côté de l'antitoxine et de la toxine, peut entraîner mécaniquement la toxine, si celle-ci n'est pas neutralisée par l'antitoxine, comme par exemple le phosphate de chaux entraîne la toxine tétanique et diphtérique.

Nous croyons pouvoir expliquer ainsi l'existence de cette substance coagulante : elle est le produit secondaire de l'action cellulaire qui préside à la formation des corps anti-toxiques, elle se fabrique à côté d'eux et les accompagne ; c'est ainsi que dans les fermentations, à côté du principal produit, il y a souvent un ou plusieurs autres composés chimiques. La même chose se passe dans l'immunisation contre le sérum d'anguille ; au fur et à mesure qu'elle avance, il se forme de moins en moins de coagulines, jusqu'au moment où il ne s'en forme plus du tout, quoique le sang de l'animal immunisé possède encore de l'antitoxine en quantité appréciable.

Maintenant il faut examiner un autre phénomène qu'on observe pendant l'immunisation contre le sérum d'anguille à savoir le développement des propriétés agglutinantes chez les animaux immunisés. Mettons dans un verre de montre 1-2 gouttes de sérum d'un animal qui a reçu un assez grand nombre d'injections de toxine ; introduisons dans ce sérum une goutte de sang défibriné d'anguille : à peine les liquides sont-ils mélangés que nous apercevons des îlots innombrables se former dans ce mélange homogène ; ces îlots, qui deviennent de plus en plus grands, sont formés par des globules rouges agglutinés ; bientôt le liquide entre les îlots est devenu tout à fait clair et transparent. Le phénomène a une analogie complète avec l'agglutination des émulsions microbiennes par les sérums spécifiques. Si nous laissons le mélange agglutiné pendant un temps assez long en le protégeant contre la dessiccation, nous

pourrons observer parfois la dissolution de l'hémoglobine dans le liquide, qui prend une teinte rose : les hématies se dissolvent peu à peu. Le même phénomène s'observe avec le sérum des lapins immunisés contre le sérum de cheval et les globules du cheval.

Le fait très intéressant a été décrit pour la première fois par M. Bordet [1] et peut être constaté dans beaucoup de cas. La propriété des sérums d'agglutiner des globules d'une autre espèce animale n'est pas, à vrai dire, une propriété nouvellement acquise à la suite de l'immunisation : elle peut exister dans beaucoup de sérums, mais à divers degrés d'intensité, de même que la propriété dissolvante. Cependant, l'injection d'un sang étranger (ou d'un sérum) à un animal exalte la propriété agglutinante et globulicide de son sérum vis-à-vis des globules du sang injecté. D'un autre côté il y a des sérums incapables d'agglutiner certains sangs ; mais il suffit d'injecter ce sang pendant quelque temps pour donner au sérum une force agglutinante considérable. Prenons par exemple le sérum d'anguille : il n'agglutine les globules du lapin et du cobaye que très tard, au moment de la dissolution. En injectant dans le péritoine des anguilles le sang de lapin ou de cobaye, nous avons tellement exalté la propriété agglutinante de leurs sérums qu'ils agglutinaient déjà presque instantanément, même après chauffage à 55° pour leur enlever leur propriété dissolvante.

La ressemblance entre ces propriétés des sérums et les pouvoirs agglutinant et bactéricide s'accentue encore davantage par le fait qu'elles se comportent de même vis-à-vis de la température : le chauffage à 55° détruit la propriété globulicide en laissant intacte la propriété agglutinante : cette dernière ne disparaît pas à une température fixe, et diminue à partir de 60-70° jusqu'à sa disparition complète.

A quel moment la propriété agglutinante apparaît-elle dans le sang des animaux soumis à l'immunisation ? Il n'est pas possible de déduire une règle de nos observations, parfois elle apparaissait très tôt, lorsqu'il y avait beaucoup d'antitoxine dans le sang et que le sérum donnait un précipité abondant avec la toxine (voir les cas VII, VII, XIX, chèvre, chiens I et II) ; dans

1. Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum d'animaux injectés de sang défibrinés. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 688.

d'autres cas, et ceux-là étaient plus nombreux, la propriété agglutinante apparaissait plus tard, succédant à l'antitoxicité, et lorsque le sérum de l'animal immunisé ne donnait plus ni trouble, ni précipité avec la toxine (cas XI', XII', et XII'' XIV, XVII, XVIII, et XVIII', chiens I et I', III et IV). Quoi qu'il en soit, la propriété agglutinante n'est en relation ni avec l'antitoxine, ni avec la substance coagulante. Prenons les globules de cheval séparés du sérum; faisons-en une émulsion homogène dans de l'eau physiologique; ce mélange s'agglutinera par le sérum des lapins traités par l'injection du sérum de cheval aussi vite et aussi parfaitement que le sang entier. Par contre, faisons une semblable émulsion de globules de lapin ou de cobaye, dans le sérum de cheval; le même sérum de lapin traité ne donnera aucune agglutination.

Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer tous ces phénomènes; dans tous les cas, nous voulons seulement signaler que la formation de précipité (la coagulation) dans le sérum n'y joue aucun rôle, comme on pourrait le penser au premier coup d'œil, surtout après les recherches de MM. Kraus et Nicolle. Il est évident que la coagulation peut aussi entraîner les particules nageant dans le liquide, mais ce fait n'a rien à faire avec la vraie agglutination de globules rouges.

L'analyse de ces faits suggère involontairement l'idée que, dans les expériences de MM. Kraus et Nicolle, il faudrait peut-être distinguer la précipitation des liquides de culture du phénomène de l'agglutination microbienne. Si celle-ci dépendait exclusivement de l'insolubilisation d'une certaine substance dissoute dans le liquide, on observerait toujours la formation de précipités dans les liquides de culture filtrés sous l'action des sérums spécifiques. M. Kraus lui-même note qu'on ne voit rien de pareil.

D'un autre côté nous avons des exemples de microbes, comme le bac. tétanique, qui s'agglutinent très bien, sans qu'il y ait jamais de précipités dans le liquide des cultures de ce microbe. Enfin, dans les expériences de Nicolle, l'agglutination des cultures filtrées (la formation de coagulum) se manifestait toujours beaucoup plus lentement et plus tard que l'agglutination des microbes, et l'addition d'autres corps microbiens ou de poudres en accélérait seulement un peu la marche.

Tout ce que nous avons exposé plus haut peut être résumé ainsi :

1. Les lapins, les chiens, les chèvres et les pigeons se laissent facilement immuniser contre le sérum d'anguille; il est infiniment plus difficile d'immuniser les cobayes.

2. Dans le sang des animaux immunisés apparaît une antitoxine qui neutralise *in vitro* l'action dissolvante de la toxine sur les globules rouges du lapin, et, injectée dans le sang avec la toxine, l'empêche d'exercer son action nuisible.

3. Cette antitoxine apparaît dans le sang très tôt, déjà après 2 à 4 injections, et chez le lapin elle est à ce moment à son maximum; sa valeur en général n'est pas grande.

4. Au cours de l'immunisation prolongée, la valeur de l'antitoxine diminue progressivement, quoique la résistance des lapins contre la toxine augmente.

5. Les globules rouges des lapins immunisés deviennent moins solubles dans le sérum d'anguille que les globules neufs.

6. Cette résistance n'est pas en rapport avec la présence de l'antitoxine dans le sang de l'animal immunisé; au contraire, il s'observe un certain antagonisme entre la résistance des globules rouges et la valeur de l'antitoxine, et dans les cas où celle-ci est forte, la solubilité des globules peut même être augmentée.

7. Les injections du sérum d'anguille dans le sang sont suivies d'une diminution notable du nombre des leucocytes chez un animal neuf, et d'une augmentation ou d'une diminution insignifiante chez les lapins immunisés.

8. En mélangeant le sérum d'anguille avec une antitoxine forte, provenant d'un animal depuis peu de temps en immunisation (lapin, chèvre, cobaye, chien), on obtient un trouble et un précipité semblable à celui qui a été observé par M. Kraus dans les cultures filtrées de microbes; il est insoluble dans l'eau, les sels neutres et les carbonates alcalins, se dissout facilement dans les alcalis et les acides. Sa formation ressemble à la coagulation d'une substance dissoute dans le sérum toxique ou anti-toxique.

9. Le volume du précipité est ordinairement en rapport avec la valeur de l'antitoxine; la formation du précipité est empêchée par le chauffage de l'antitoxine à 70° pendant une 1/2 heure ; de même un chauffage du sérum d'anguille à 80° le rend incoagulable par l'antitoxine; mais déjà la température de 58° diminue

notablement la propriété de donner un précipité chez la toxine comme chez l'antitoxine.

10. La propriété coagulante n'est pas liée directement à l'antitoxine : on rencontre des sérums antitoxiques qui n'en présentent aucune trace.

11. Les sérums antitoxiques acquièrent très tôt la propriété d'agglutiner et même de dissoudre les globules rouges de l'animal dont le sang (ou le sérum) a servi pour les injections ; cette propriété s'accroît au cours de l'immunisation ; elle peut être provoquée chez les animaux, dont le sérum n'est pas du tout agglutinant à l'état normal, par des injections du sang ou du sérum correspondant ; la température qui détruit cette propriété des sérums traités correspond à celle qui empêche l'agglutination des microbes.

12. La propriété d'agglutiner les globules rouges n'a rien à faire avec la propriété coagulante, et peut être très prononcée dans des sérums qui ne coagulent pas la « toxine » correspondante.

13. L'agglutination des globules rouges n'est pas causée par la coagulation des substances dissoutes dans la partie liquide, ainsi qu'on pourrait le croire après les recherches de MM. Kraus et Nicolle.

En terminant cette étude, je me fais un devoir bien agréable de remercier chaleureusement mes chers maîtres, MM. Roux et Metchnikoff, pour leur bienveillant accueil.

APPENDICE

Lapin 1. — Poids 2,160. 9/IX. — 0,1 c. c. de sér. d'anguille frais dans le sang. 20/IX. — 2,000. Saignée (50 c. c. de sang).

Lapin 2. — Poids 1,900. 27/IV. — 0,05 dans la veine. 30/IV encore 0,1 sous la peau. 5/V. — 0,1 dans le sang. 15/V. — 0,1. 23/V. — 0,1. 30/V. — 0,225 ; 6/VI. — Saignée (50 c. c. de sang).

Lapin 3. - Poids 2,130. 23/IV. — 0,2 sous la peau. 25/IV encore 0,25 sous la peau. 2/V. — 0,1 dans le sang. 23/V. — 0,1. 30/V. — 0,1. 5/VI. — 0,15. 11/VI. — 0,2. 22/VI. — 0,2. 25/VI. — Saigné à blanc (poids 2,060).

Lapin 4. — Poids 1,840. 22/IV. — 0,01 sous la peau. 25/IV. — 0,1 sous la peau. 2/V. — 0,1 dans le sang. 23/V. — 0,15 sous la peau. 30/V. — 0,1 ; 5/VI. — 0,15 ; 20/VI et 26/VI, 4/VII et 11/VII. — 0,2 dans le sang (poids 2,320). 19/VII. — Saignée (50 c. c.). 26/VII. — 0,1 dans le sang. 3/VIII. — 0,15. 8/VIII et 26/VIII par 0,2. 30/VIII a été saigné (50 c. c.). Ultérieurement supportait facilement 0,4 de sérum d'anguille dans le sang.

Lapin 5. — Poids 2,100. 19/IX. — 0,1 dans le sang. 25/IX. — 0,1. 12/X. — Saigné à blanc (le poids avait baissé jusqu'à 1,600).

Lapin 6. — Poids 2,320. 4/XI. — 0,1 dans le sang. 16/XI. — 0,15. 28/XI prélevé 50 c. c. de sang.

Lapin 7. — Poids 2,020. 13/XI. — 0,2 de sér. chauffé à 55° dans le sang. 23/XI. — 0,15, 8/XII. — prélevé 50 c. c. de sang (poids 1,840). 12/XII. — 0,15 à 55° et le 19/XII 0,2 de sér. frais. 26/XII. — encore une fois prél. 50 c. c. de sang.

Lapin 8. — Poids 1,760. 13/XI. — 01 de sér. chauffé à 55° dans le sang. 23/XI. — 0,12. 8/XII. — 0,15. 15/XII. — Extr. 50 c. c. de sang. 17/XII. — injecté, pour essayer la résistance, 1 c. c. de sér. frais d'ang. dans la veine (de même au lapin XVIII); très malade, puis paraît se rétablir un peu. 26/XII. — Nouvelle prise de 50 c. c. de sang. Mort le 28/XII.

Lapin 9. — Poids 1,700. 9/IX. — 0,08 dans le sang. 4/X et 13/X. — 0,1 sous la peau. 24/X. — 0,15 dans le péritoine. 4/XI. — 0,15 dans le sang. 18/XI. — Tué par la saignée (poids 1,700).

Lapin 10. — Poids 2,190. 22/IV. — 0,01 sous la peau. 25/IV. — 0,2 sous la peau. 27/IV. — 0,1 dans le sang. 11/V. — 0,1. 23/V. — 0,1. 30/V. — 0,1. 5/VI. — 0,2. 11/VI. — 0,25. 20/VI, 26/VI, 9/VII et 11/VII. — 0,2. 20/VII et 28/VII. — 0,25 (poids 2,500). 2/VIII. — Prise de 50 c. c. de sang. 8/VIII. — 0,01. 17/VIII. — 0,2. 23/VIII. — Saigné à mort.

Lapin 11. — Poids 1,900. 20/VI. — 0,05 dans le sang. 26/VI. — 0,1. 11/VII. — 0,1. 18/VII, 26/VII et 3/VIII. — 0,15. 8/VIII et 16/VIII. — 0,2. 26/VIII et 3/IX. — 0,25. 11/IX. — Prise de 50 c. c. de sang (poids 2,460). 19/IX. — 0,1. 27/IX. — 0,15. 6/X. — 0,2 (poids 2,500). 14/X. — 0,25. 24/X. — 0,3 et 4/XI. — 0,35. 15/XI. — Prise de 50 c. c. de sang. 28/XI. — 0,2 sous la peau. 8/XII. — 0,25 dans le sang. (A commencé à maigrir; poids le 7/XII, 1,940). 17/XII. — Tué par prise de tout le sang.

Lapin 12. — Poids 2,240. 17/VIII, 26/VIII, 2, 11, 19 et 27/X. — 0,2 de sér. chauffé à 60° dans le sang. 6 et 14/X. — 0,3 et 0,35 du même sér. 29/X. — Prise de 50 c. c. de sang (poids 2,500). 4/XI. — 0,2 sér. chauffé à 58°. 6/XI. — 0,2 chauffé à 55°. 16/XI. — 0,25 à 55°. 23 et 30/XI. — 0,3 et 0,4 à 55°. 11/XII. — Prise de 50 c. c. de sang. 19/XII. — 0,25 à 55°. 24/XII. — Encore une prise de 50 c. c. de sang.

Lapin 13. — Poids 2,160. 2/IX, 11 et 19/IX. — 0,1. 25/IX. — 0,15. 4/X. — 0,15 dans le péritoine. 13/X. — 0,2 dans le sang. 24/X. — 0,25. 10/XI. — Prise de 50 c. c. de sang (poids 2,300). 17/XI. — 0,15. 28/XI. — 0,2. 8/XII. — 0,25. 16/XII. — 0,35. 17/XII. — Prise de 50 c. c. de sang.

Lapin 14. — Poids 1,880. 3/X. — 0,1 dans le sang. 15/V, 24 et 30/IV. — 0,1. 5/VI, 12, 22, 1/VII et 11/VII. — 0,2. 20 et 28/VII. — 0,25. 5/VIII. — Prise de 50 c. c. de sang (poids 2,500). 12/VIII. — 0,1. 26/VIII et 3/IX. — 0,2. 11/IX et 19/IX. — 0,25. 27/IX. — 0,3. 6/X. — 0,35. 14/X. — 0,4. 31/X. — (Poids 2,600). Prise de 50 c. c. de sang.

Lapin 15. — Poids 1,800. 28/VI, 28/VII, 18/VIII, 2, 11 et 19/IX. — 0,2 de sér. d'ang. frais mélangé avec 0,1 de liquide de Gram dans la veine. 25/IX et 4/X. — 0,25 sér. + 0,1 l. de Gr. 13/X. — 0,2 de sér. sans iode. 24/X, 4 et 16/XI. — 0,3 sér. pur. 28/XI. — 0,4. 11/X. — Prise de 50 c. c. de sang.

Lapin 16. — Poids 1,720. 19/IX et 25/IX. — 0,15 de sér. d'ang. chauffé à 60o dans le sang. 6 et 14/X. — 0,2 id. 24/X. — 0,25 id. 4/XI. — 0,3 id. 6/XI et 16/XI. — 0,1 de sér. chauffé à 55o. 28/XI. — 0,15 à 55o. 12/XII. — Prise de 50 c. c. de sang.

Lapin 17. — Poids 2,260. 12/VII. — 0,1 dans le sang. 20 et 28/VII. — 0,1. 7/VIII et 16/VIII. — 0,15. 26/VIII et 2/IX. — 0,2. 11, 19 et 25/IX. — 0,25 (poids 2,500). 4/X. — 0,3. 14/X. — Prise de 50 c. c. de sang. 24/X. — 0,2. 4/XI. — 0,3. 16/XI. — 0,4. 28/XI. — 0,5. 8/XII. — Prise de 50 c. c. de sang. 19/XII. — (Poids 2,550). 0,3. 23/XII. — Pour essayer la résistance contre le poison, injection de 1,5 c. c. de sér. frais dans la veine; après quelques mouvements cloniques, se rétablit vite et pesa le 28/XII 2,600.

Lapin 18. — Poids 1,800. 4/VII. — 0,5 dans le sang. 16 et 26/VII. — 0,1. 3, 7 et 16/VIII. — 0,15. 26/VIII et 2/IX. — 0,2 (poids 2,550). 9, 15 et 25/IX. — 0,25. 4 et 13/X. — 0,3. 24/X. — 0,35. 4/XI. — Prise de 50 c. c. de sang. 17/XI. — 0,2. 28/XI. — 0,3. 8/XII. — 0,35. Depuis ce moment, le poids allait en diminuant et au 5/XII baissa de 2,500 à 2,000. 5/XII. — Prise de 50 c. c. de sang. 17/XII. — Pour éprouver la résistance, injection de 1 c. c. de sér. d'ang. à la fois dans la veine (poids 1,900). Le lapin était apparemment peu malade après l'injection et commença bientôt à manger, mourut quand même 3 jours plus tard. Rien de pathologique à l'autopsie. (Amaigrissement).

Lapin 19. — Poids 2,060. 11, 19 et 25/IX. — 0,15 de sér. chauffé à 60o. 4, 14 et 24/X. — 0,2, 0,25 et 0,3 id. 2/XI. — Prise de 50 c. c. de sang.

Cobaye A. — Poids 500. 26/VI et 5/VII. — 0,05 sous la peau. 20/VIII. — 0,075. 28/VII, 7, 17 et 27/VIII. — 0,1. 4, 14 et 28/X. — 0,1 dans le péritoine. 16/XI. — Prise de 5 c. c. de sang. 30/XI et 15/XII. — 0,1 dans le périt. 31/XII. — Tué par prise de sang.

Chien 1. — Poids env. 15 kilos. 16/IX et 27/IX. — 0,2 sous la peau. 6 et 16/X. — 0,3. 27/X. — Prise de 80 c. c. de sang. 2/XI. — 0,3 dans la veine. 9/XI. — 0,4 id. 17/XI. — 0,5 id. 2/XII. — Prise de 100 c. c. de sang.

Chien 2. — Poids env. 15 kilos. 21, 23 et 30/XI. — 0,5 de sér. chauffé à 55o sous la peau. 3/XII. — Prise de 100 c. c. de sang.

Chien 3. — Poids 12 kilos. 25 et 30/XI. — 0,5 chauffé à 55o sous la peau. 3/XII. — Prise de 100 c. c. de sang.

Chien 4. — Poids 8 kilos. 25 et 30/XI. — 0,5 de sér. frais sous la peau. 3/XII. — Prise de 80 c. c. de sang.

Chèvre. 22/XI. — 0,5. 23/XI. — 0,25. 26/XI. — 40. 30/XI. — 0,4. 6 et 11/XII. — 0,5. 21/XII. — Prise de 100 c. c. de sang.

Poules I et II ont reçu dans le péritoine : 15/VIII et 30/VIII. — 0,1. 9, 17, 25/IX et 6/X. — 0,15. 24/X. — 0,2. 31/X. I. Tuée par prise de sang. II. Reçut encore 0,2 et est tuée 16 jours après la dernière injection.

MARQUE des ANIMAUX	DOSE de TOXINE REÇUE	ANTITOXICITÉ *in vitro* (Contre la dissolution)	ANTITOXICITÉ *in vivo* (Pour le lapin)	REMARQUES	TROUBLE et PRÉCIPITÉ	AGGLUTINATION	SOLUBILITÉ des GLOBULES ROUGES
Lapin I.....	0,8[1]	Nulle.	Nulle.		Trouble faible.	Très faible.	
— II....	0,675	10 : 1	Un peu infér. à 20 : 1	Lapin avec 0,4 de toxine + 4,0 d'antitoxine ; mort en 4 minutes. Lapin avec 0,24 de toxine + 4,8 d'antitoxine ; était malade, survit.	Abond. précipité.		
— III...	1,3				Précipité très abond.		
— IV...	2,2	30 : 1		Pas d'expérience *in vivo*.			Beaucoup moindre que le sang neuf.
— V....	0,2	12 1/2 : 1	12 1/2 : 1		Abond. précipité.		
— VI...	0,25	20 : 1	inférieure à 20 : 1	Lapin avec 0,2 de toxine + 4,0 d'antitoxine ; mort en 2 jours.	Abond. précipité.	Pas d'agglutination.	
— VII..	0,25 (chauffé à 55°)	20 : 1	20 : 1	Lapin avec 0,1 de toxine + 1,0 d'antitoxine : était malade.	Trouble et précipité.	Agglutine vite	
— VII'..	0,6	environ 15 : 1	15 : 1		Précipité médiocre.	Lentement.	Beaucoup moindre que le sang neuf.
— VIII..	0,37 (chauffé à 55°)	20 : 1	20 : 1		Abond. précipité.	Lentement.	Beaucoup plus facile que le sang neuf.
— VIII'.	1,37	environ 15 : 1	15 : 1		Abond. précipité.	Agglutine instantanémt.	Beaucoup moindre que le sang neuf.
— IX...	0,58	35 : 1		Pas d'expérience *in vivo*.	Trouble et précipité.	Lentement mais bien.	
— X....	2,4	30 : 1	30 : 1		Assez grand précipité.		Aussi bien que le sang neuf[2].
— XI...	1,6	25 1	25 : 1		Abond. précipité.		Aussi bien que le sang neuf.

MARQUE des ANIMAUX	DOSE de TOXINE REÇUE	ANTITOXICITÉ *in vitro* (Contre la dissolution)	ANTITOXICITÉ *in vivo* (Pour le lapin)	REMARQUES	TROUBLE et PRÉCIPITÉ	AGGLUTINATION	SOLUBILITÉ des GLOBULES ROUGES
Lapin XI'..	2,95	inférieure à 50 : 1	inférieure à 50 : 1	Lapin avec 0,12 de toxine + 6,0 d'antitoxine; mourut cachectique après 18 jours.	Pas de précipité.	Agglutine instantanément[1].	Aussi bien que le sang neuf.
— XI''..	3,4	20 : 1[3]	inférieure à 20 : 1	Lapin avec 0,2 de toxine + 4,9 d'antitoxine; mort en 6 jours.	Petit trouble et précipité.	Agglutine très vite.	Moins bien que le sang neuf.
— XII..	1,8 (chauffé à 60°)	50 : 1[4]	40 : 1	Lapin avec 0,3 de toxine + 6,0 d'antitoxine; mort en 15 jours. Lapin avec 0,3 de toxine + 12,0 d'antitoxine; survit.	Médiocre.		Plus difficilement que le sang neuf.
— XII'..	3,25 (à 50° à prés.)	entre 20 : 1 et 30 : 1[5]	30 : 1	Lapin avec 0,1 de toxine + 2,0 d'antitoxine; était malade.	Nul.	Agglutine instantanément[1].	
— XII''..	3,5 (chauffé à 55°)	80 : 1	inférieure à 60 : 1	Lapin avec 0,15 de toxine + 9,0 d'antitoxine; mort en 3 jours.	Nul.	Agglutine instantanément[1].	Presque plus.
— XIII..	1,5	Presq. nulle[6]	inférieure à 50 : 1		Nul.	Faible.	Aucune différence avec le sang neuf.
— XIII'.	2,0	au-dessous de 50 : 1	beaucoup inf. à 50 : 1	Lapin avec 0,2 de toxine + 10,0 d'antitoxine; mort en 48 heures.	Nul.	Agglut. lentement.	Aucune différence avec le sang neuf.
— XIV..	3,95	40 : 1	inférieure à 40 : 1	Lapin avec 0,3 de toxine + 12,0 d'antitoxine; mort en 15 jours.	Nul.	Agglutine instantanément[1].	Beaucoup moins bien que le sang normal.
— XV..	(avec l. de Gram) 3,2	entre 40 : 1 et 50 : 1	40-50 : 1		Trouble sans précipité.	Agglut. lentement.	

1. Une seule injection dans la veine a été insuffisante pour provoquer des propriétés antitoxiques
2. Malheureusement les quantités de sérum d'augmentation dans l'expérience sur la dissolution ont été prises trop grandes.
3. L'augmentation d'antitoxicité n'a apparu que dans ce cas, où le lapin fut saigné mourant.
4. La petite valeur de l'antitoxicité s'explique peut-être par le chauffage du sérum à une temp. trop élevée qui détruit déjà la toxicité.
5. L'injection du sérum moins affaibli a provoqué une augmentation d'antitoxicité.
6. Dans ce cas il n'y avait pas de formation d'antitoxine pour des raisons inconnues.

Lapin XVI..	1,25 à 60° et 0,35 à 55°[7]	40 : 1	40 : 1	Lapin avec 0,1 de toxine + 3,0 d'antitoxine ; était malade.	Trouble.	Agglutine instantanémt.	
— XVII.	2,05	50 : 1	inférieure à 50 : 1		Nul.	Agglutine instantanémt.	Aussi bien que le sang normal.
Lapin XVII'..	3,4	inférieure à 80 : 1	70 : 1	Lap. av. 0,1 tox. + 5,0 d'antitoxine ; était très malade.	Nul.	Agglutine vite.	
— XVII''.	3,7			Pas d'épreuves d'antoxicité.			Comme un sang normal.
— XVIII.	2,6	inférieure à 30 : 1	inférieure à 30 : 1	Lapin avec 0,3 de toxine + 9,9 d'antitoxine ; meurt au bout de 9 jours.	Nul.	Agglutine instantanémt.	Un peu moins que le sang neuf.
— XVIII'.	3,45	60 : 1	inférieure à 60 : 1	Lap. av. 0,15 de toxine + 9,0 d'antitox. ; m. en 7 jours.	Nul.	Agglutine instantanémt.	Beaucoup plus difficilement que le sang neuf.
— XVIII''	4,45	inférieure à 80 : 1	60 : 1	Lap. av. 0,2 de tox. + 12,0 d'antitox., survécut ; un autre avec 0,2 de tox. + 8,0 d'antitox. : très mal.	Nul.	Pas d'agglutination.	Insolubilité encore plus prononcée.
— XIX ..	1,2 (chauff. à 60°)[8]	40 : 1	inférieure à 20 : 1	Lapin avec 0,3 de toxine + 6,0 d'antitoxine ; mort au bout de 4 jours.	Trouble et précipité.	Agglutine instantanémt.	Aussi bien que le sang neuf.
Cobaye A...	1,2	15-20 : 1			Trouble et préc. abondant.	Faible.	
Chien I.....	1,2	30 : 1	30 : 1		Trouble, pas de préc.	Assez forte.	
— I'....	2,4	15 : 1	inférieure à 15 : 1	Lap. av. 0,2 de tox. + 3,0 d'antit. ; était un peu mal.	Nul.	Pas d'agglutination.	
— II....	1,5 (chauffé à 55°)	40-50 : 1	beaucoup inf. à 40 : 1	Lap. av. 0,2 de tox. + 8,0 d'antitox. ; m. en 3 jours.	Précipité assez grand.	Agglutine instantanémt.	
— III...	1,0 (chauffé à 55°)	inférieure à 40 : 1	beaucoup inf. à 40 : 1	Lapin avec 0,2 de toxine + 8,0 d'antitoxine ; mort au bout de quelques heures.	Nul.	Agglutine instantanémt.	
— IV...	1,0	inférieure à 40 : 1	beaucoup inf. à 45 : 1	Lapin avec 0,2 de toxine + 9,0 d'antitoxine ; tuèrent très vite.	Nul.	Agglutine instantanémt.	
Chèvre.....	3,15	10 : 1	10-12 : 1		Abondant.	Foudroyante.	

7. En réalité il n'a reçu que 0,35 de sérum d'augmentation actif.
8. Le sérum d'anguille, dans ce cas, a été chauffé à une température très élevée.

LA PHAGOCYTOSE CHEZ LE PIGEON

A L'ÉGARD DU BACILLE TUBERCULEUX AVIAIRE ET DU BACILLE HUMAIN

(CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ NATURELLE)

PAR M. DEMBINSKI

(Travail du laboratoire de M. le professeur Grancher.)

Historique. — Il existe une série de travaux importants sur le rôle des leucocytes dans la tuberculose.

M. Metchnikoff[1], en 1888, a étudié sur le spermophile le rôle phagocytaire des cellules géantes. Il a démontré que les bacilles tuberculeux dégénèrent à l'intérieur des cellules géantes. A côté des bacilles normaux, il a vu des bacilles qui prennent une couleur rose faible (double coloration à la fuchsine et bleu de méthylène), d'autres qui ne prennent aucune couleur ou se colorent en bleu. Enfin, il a constaté, à l'intérieur des cellules, des corps jaunes, ayant une forme de boudins, et rappelant par leur configuration générale les bacilles tuberculeux.

Quant au stade initial de la phagocytose, M. Metchnikoff a observé les phénomènes suivants : lorsqu'on injecte la culture tuberculeuse sous la peau, dans la chambre antérieure de l'œil ou dans le sang, les bacilles sont immédiatement englobés par les leucocytes polynucléaires ; ensuite apparaissent les grands leucocytes mononucléaires, qui à leur tour englobent des bacilles et même des leucocytes polynucléaires avec leurs bacilles.

M. Borrel[2], qui a étudié la phagocytose dans le poumon et dans le rein du lapin, est arrivé aux mêmes résultats : au début il a vu des leucocytes polynucléaires remplis de bacilles ; ces leucocytes commencent à dégénérer vers le 3e jour : leur noyau se fragmente en gouttelettes chromatiques et devient trouble. Vers le 5e jour, les leucocytes polynucléaires

1. METCHNIKOFF, *Ueber die phagocytäre Rolle der Tuberkelriesenzelle. Virchow's Archiv*. 1888, t. CXIII, p. 63.

2. BORREL, Tuberculose pulmonaire expérimentale. Ces *Annales*, 1893 et 1894.

disparaissent, leur rôle est terminé. Dès la fin du 2e jour, on constate l'arrivée de nouveaux éléments, dont le rôle est plus durable : les grands leucocytes mononucléaires (à noyau unique vésiculeux, à protoplasme abondant).

Les conclusions, auxquelles sont arrivés MM. Kostenitch et Wolkow[1] dans leur travail sur le développement du tubercule expérimental, ne concordent pas avec celles des auteurs précédents. Tandis que ces derniers ont observé très facilement l'englobement des bacilles par les leucocytes polynucléaires et mononucléaires, MM. Kostenitch et Wolkow n'ont pas pu parvenir à voir les leucocytes englobant des bacilles; ils n'ont observé que des rapports de voisinage entre les leucocytes et les bacilles.

Tout récemment M. Broden[2] a publié ses recherches sur l'histogénèse du tubercule où il dit que, dans les premiers jours de la réaction, les bacilles, pour la plus grande part, sont englobés dans les leucocytes, pour la part la plus petite, dans les éléments immobiles. Quelques jours plus tard, les leucocytes renfermant des bacilles disparaissent, et l'on ne trouve plus de bacilles que dans les éléments immobiles. Ces derniers entrent en division, fournissant un néoplasme qui constitue le tubercule.

Ce court résumé suffit à montrer que le rôle des phagocytes dans la tuberculose est loin d'être élucidé.

Ce mémoire est une contribution à cette étude. Nous avons observé la phagocytose chez le pigeon et comparé la réaction phagocytaire à l'égard du bacille des mammifères et du bacille aviaire.

Technique. — La culture du bacille aviaire provenant du pigeon et celle du bacille de Koch provenant du lapin nous ont été obligeamment fournies par MM. les docteurs Ledoux-Lebard et Auclair.

Nous avons réensemencé la première dans le bouillon, la seconde sur la pomme de terre glycérinée, et nous les avons injectées trois semaines après. Pour l'injection de la culture aviaire on la délayait dans deux fois son volume de bouillon stérile; quant à la culture du bacille humain, on en prélevait une parcelle qui

1. Kostenitch et Wolkow, Recherches sur le développement du tubercule expérimental. *Archives de méd. exp. et d'anatomie path.*, 1892, p. 741.

2. Broden, Recherches sur l'histogénèse du tubercule. *Archives de méd. exp. et d'anat. path.*, 1899, n° 1.

servait à faire une émulsion dans du bouillon stérile. L'injection était faite dans la région sternale après désinfection de la peau.

Tout d'abord nous avons étudié la phagocytose par la prise de quelques gouttes d'exsudat, prélevées après des intervalles de temps variables.

Il n'est pas possible d'étudier l'évolution de la phagocytose sur un seul pigeon, car en prenant de l'exsudat plusieurs fois au même oiseau, on s'expose à le contaminer par d'autres microbes et à troubler l'évolution normale de la phagocytose.

Nous inoculions la culture de la tuberculose à une série de pigeons en ne faisant qu'une prise d'exsudat à chacun d'eux, mais au bout de différents intervalles de temps. En procédant

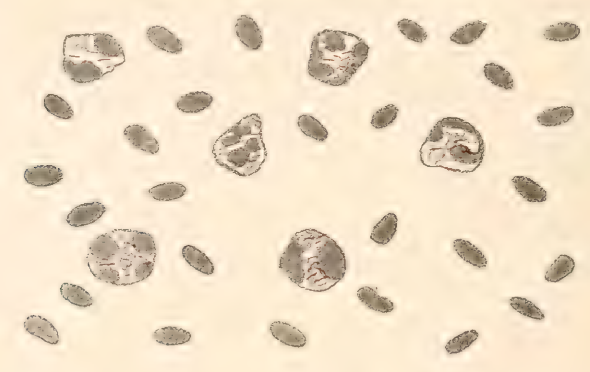


Fig. 1
La phagocytose polynucléaire au bout de 24 heures chez le pigeon inoculé avec le bacille aviaire (frottis).

ainsi, nous obtenions une série de préparations, qui nous permettaient de suivre l'évolution de la phagocytose.

Pour contrôler ces premiers résultats, nous répétions cette expérience sur une nouvelle série de pigeons, dont l'exsudat était recueilli et examiné après les mêmes intervalles.

Les préparations étaient fixées par le mélange d'alcool et d'éther, colorées par la fuchsine, traitées par l'acide sulfurique à 20 0/0 et l'alcool, et colorées enfin au bleu de méthylène.

Dans cette étude, l'examen des gouttes d'exsudat, quoique très instructif, est insuffisant. Nous avons fait, à différents intervalles de temps après l'inoculation, l'examen du tissu inoculé par la méthode de coupes. Un fragment de la peau et du tissu cellu-

laire sous-cutané était plongé pendant deux heures dans le mélange suivant :

Eau bouillante	100	grammes.
Bi-chlorure de mercure	7,5	—
Ac. acétique pur	5	—

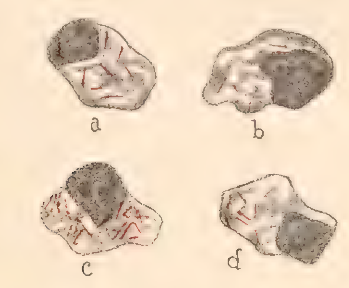


Fig. 2.
La phagocytose mononucléaire au bout de 5 jours chez le pigeon inoculé avec le bacille aviaire (frottis).

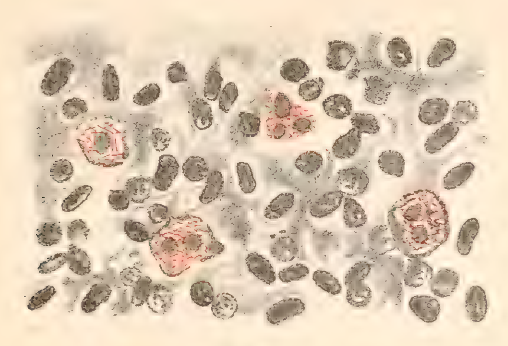


Fig. 3.
La phagocytose polynucléaire au bout de 24 heures chez le pigeon inoculé avec le bacille aviaire (coupe).

puis dans l'alcool à 90° pendant 24 heures, dans l'alcool absolu pendant quatre heures. dans l'huile de cèdre pendant 24 heures, et enfin dans la paraffine fondant à 50° et renouvelée au bout de 3 heures.

Les coupes étaient colorées comme les lamelles d'exsudat, à la fuchsine et au bleu de méthylène.

Recherches sur le bacille aviaire. — Nous avons inoculé sous la peau 1 c. c. de la culture du bacille aviaire à une série de 20 pigeons.

Pendant les 15 premiers jours après il n'y a pas eu de réaction macroscopique. Ce n'est que plus tard, 3 semaines, un mois après, qu'on vît apparaître, au lieu d'injection, un nodule dur et blanchâtre, qui, primitivement, possédait le volume d'une lentille, mais qui, ultérieurement, atteignait parfois le volume d'une noisette ou même plus.

Une demi-heure après l'inoculation, à l'examen microscopique de l'exsudat, on observe dans chaque préparation beaucoup de bacilles libres et quelques leucocytes polynucléaires, mais pas de phagocytose.

Au bout de 2 heures, on constate beaucoup de bacilles libres et des leucocytes polynucléaires plus nombreux qu'au 1er examen. Quelques leucocytes polynucléaires ont englobé des bacilles, mais la phagocytose est en général faible. On voit de temps en temps, quoique très rarement, des leucocytes mononucléaires à noyau pâle et protoplasma abondant, mais jamais ces leucocytes n'englobent de bacilles, pendant les 2 premiers jours.

Même résultat, avec une leucocytose encore plus prononcée, pour l'examen de l'exsudat prélevé au bout de 5 heures.

L'exsudat de 24 heures contient plusieurs leucocytes polynucléaires remplis de bacilles (fig. 1). Il y a çà et là quelques leucocytes mononucléaires, mais ils ne présentent pas de bacilles englobés.

Ces leucocytes mononucléaires deviennent plus abondants dans l'exsudat de 48 heures. Ils commencent à présenter des bacilles englobés. Il y a encore beaucoup de polynucléaires.

Le 4e jour, le nombre de grands leucocytes mononucléaires s'est encore accru. La phagocytose mononucléaire est aussi beaucoup plus prononcée. Les polynucléaires diminuent et leurs noyaux dégénèrent en se fragmentant en grains chromatiques. On remarque quelques mononucléaires englobant des leucocytes polynucléaires avec leurs bacilles.

Le 5e jour, on ne voit presque que des leucocytes mononucléaires, avec les noyaux se fragmentant en grains chromatiques, englobant des bacilles dans leur protoplasme (fig. 2 *a*, *b*, *c*, *d*) ou quelquefois dans le noyau (fig. 2 *a*.) Les leucocytes polynucléaires diminuent de plus en plus, et enfin ils disparaissent, tandis que les leucocytes mononucléaires persistent indéfiniment.

Les bacilles libres diminuent de plus en plus, mais on observe toujours quelques bacilles libres, non englobés.

Les coupes des tissus inoculés, dont on fait l'ablation après des intervalles de temps croissants, permettent également de suivre les phases successives de la phagocytose et de contrôler les résultats fournis par l'étude de l'exsudat.

Sur les coupes du tissu prélevé 24 heures après l'inoculation, on distingue nettement les leucocytes polynucléaires englobant des bacilles réunis en amas épais, et remplissant le corps protoplasmique, tandis que le noyau est entouré par la masse parasite (fig. 3).

En résumé, la phagocytose sous-cutanée chez le pigeon est surtout polynucléaire pendant les 2 premiers jours; vers le 3e, les leucocytes polynucléaires commencent à dégénérer, et vers le 5e ils disparaissent.

Les leucocytes mononucléaires apparaissent vers le 3e jour et persistent indéfiniment.

On voit que la phagocytose chez le pigeon est analogue à celle qu'ont observée M. Metchnikoff sous la peau du spermophile et M. Borrel dans le sang du lapin; cependant elle en diffère par certains détails.

Tandis que ces savants ont observé la réaction phagocytaire immédiatement après l'injection des bacilles, la phagocytose chez le pigeon est nulle au bout d'une demi-heure, elle est faible au bout de 2 à 5 heures, et elle ne s'accuse nettement qu'après 18 à 24 heures. M. Borrel n'a vu de grands leucocytes mononucléaires que dès la fin de la 2e journée, tandis que nous avons remarqué leur présence dès le début de la réaction, mais ils étaient très rares et nous ne les avons jamais vus englobant des bacilles pendant les 2 premiers jours.

Recherches sur le bacille humain. — Nous avons inoculé de même avec le bacille humain une série de 20 pigeons, et nous avons répété les expériences qui précèdent.

Au bout d'une demi-heure, on constate une grande quantité de bacilles libres, beaucoup de leucocytes polynucléaires et de mononucléaires. La phagocytose est nulle, mais on remarque une tendance du côté des leucocytes mononucléaires à entourer les groupes des bacilles.

Au bout de 2, 5 et 18 heures, mêmes phénomènes. Après 24 heures, on trouve des bacilles libres, des leucocytes polynu-

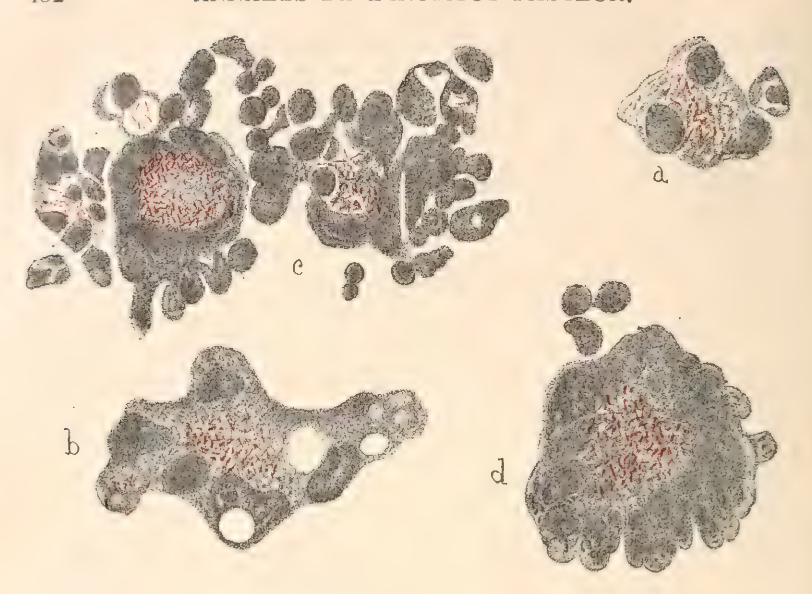


Fig. 4. — Une série de cellules géantes *a*, *b*, *c*, *d*, au bout de 24 heures chez le pigeon inoculé avec bacille humain (frottis).



Fig. 5. — Plusieurs cellules géantes au bout de 24 heures chez le pigeon inoculé avec le bacille humain (coupe).

cléaires englobant des bacilles; mais, en outre, on constate un phénomène particulier : les leucocytes mononucléaires, qui déjà au bout d'une demi-heure commençaient à circonscrire des groupes de bacilles, s'entassent bientôt en rangées circulaires autour de ces bacilles, qu'ils emprisonnent, formant comme une muraille épaisse dans laquelle les contours des cellules finissent par se confondre et devenir indistincts. Ce sont de véritables cellules géantes. On peut suivre l'évolution de ces cellules depuis les formes les plus simples jusqu'aux plus compliquées.

Il y a des cellules composées de 3, 6 leucocytes mononucléaires. Dans certaines cellules, ces leucocytes commencent à dégénérer, à se fragmenter en grains chromatiques, enfin dans quelques cellules ils ont perdu leurs contours et sont devenus indistincts (fig 4 *a*, *b*, *c*, *d*.) Les leucocytes polynucléaires ne prennent pas part à la formation de ces cellules géantes.

Les jours suivants, on rencontre de temps en temps des polynucléaires et des mononucléaires englobant des bacilles, mais en général la phagocytose est faible du côté des leucocytes isolés ; au contraire, la formation des cellules géantes est de plus en plus prononcée. Le nombre de bacilles libres, très abondant dans les premières heures de réaction, devient faible ensuite : presque tous les bacilles sont inclus à l'intérieur des cellules géantes, mais cependant on en trouve toujours çà et là de libres.

Cette formation de cellules géantes s'observe aussi et mieux encore sur les coupes des tissus inoculés. La rapidité avec laquelle elle se fait est vraiment remarquable. Au bout de 24 heures, une de nos coupes du tissu sous-cutané au niveau de l'inoculation présentait déjà 5 ou 6 de ces cellules géantes, à noyaux périphériques entourant les amas de bacilles infiltrés dans la portion centrale dégénérée de la cellule (fig. 5).

Ces expériences montrent combien la réaction phagocytaire est différente chez le pigeon, suivant qu'on l'inocule avec le bacille aviaire ou avec le bacille humain. Après l'inoculation avec le bacille aviaire, la phagocytose est très active et l'on peut y distinguer 3 stades : elle est d'abord polynucléaire, puis mixte et enfin mononucléaire. Après l'inoculation avec le bacille humain, dès le début apparaissent à la fois des leucocytes polynucléaires et mononucléaires, c'est une leucocytose mixte ini-

tiale. Quant à la phagocytose, elle n'est pas marquée, si l'on considère les leucocytes isolés. On voit bien quelques leucocytes polynucléaires et plus tard des mononucléaires englobant des bacilles, mais en somme le fait est rare. Au contraire, il y a ici comme une action collective des leucocytes qui est très manifeste. En effet, dès les premières heures, les leucocytes mononucléaires tendent à se ranger en cercle autour des bacilles ; au bout de 24 heures, les amas circulaires sont manifestes, la fusion des cellules est assez complète pour créer de véritables cellules géantes dont le nombre augmente de plus en plus.

Nous ignorons actuellement sur quoi repose la différence de virulence des bacilles humain et aviaire à l'égard de certaines espèces animales. Les faits que nous avons étudiés nous paraissent être une contribution à l'étude de cette question. Ils nous montrent que, dès son introduction dans l'organisme du pigeon, le bacille révèle déjà son origine aviaire ou humaine par la réaction cellulaire qu'il provoque. Si c'est le bacille aviaire, la phagocytose est impuissante à arrêter le développement de la maladie, soit que les cellules ne puissent digérer les bacilles englobés qui conservent leur vitalité, soit qu'il y ait trop de bacilles non englobés. Si c'est le bacille humain, il est aussitôt bloqué et rendu inoffensif par les nombreux leucocytes dont l'entassement forme la cellule géante, qui est considérée comme un moyen phagocytaire beaucoup plus puissant que les leucocytes isolés.

En terminant notre étude, nous voulons exprimer ici notre profonde reconnaissance à M. le professeur Grancher pour l'hospitalité qu'il a bien voulu nous offrir dans son laboratoire, à M. Metchnikoff pour l'intérêt qu'il nous a témoigné, et à M. le Dr Ledoux-Lebard pour la bonté avec laquelle il a guidé nos premiers pas dans la voie des recherches bactériologiques.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE
SUR LE SORT DES TOXINES ET DES ANTITOXINES
INTRODUITES DANS LE TUBE DIGESTIF DES ANIMAUX

Par le Dr G. CARRIÈRE
Agrégé des Facultés de médecine.

(Travail du laboratoire de M. le Dr Calmette, à l'Institut Pasteur de Lille.)

I

DU SORT DES TOXINES INTODUITES DANS LE TUBE DIGESTIF

De nombreux expérimentateurs, depuis longtemps déjà, ont été frappés de la façon dont les animaux supportent certaines toxines, quand celles-ci sont introduites dans le tube digestif.

Déjà, en 1888, M. Charrin avait montré que les animaux, sensibles à l'action du bacille pyocyanique, peuvent ingérer impunément de grandes quantités des produits solubles sécrétés par ce microbe.

En mai 1896, M. Gibier, dans une note succincte (*Comptes rendus*, p. 1075), établit que le chien, le lapin et le cobaye supportent, sans danger, l'introduction rectale de doses énormes de toxine tétanique, et cela sans acquérir l'immunité.

La même année (juin 1896), M. Charrin (*Arch. de Phys.*, p. 597) arrive aux mêmes conclusions et essaie de donner une explication expérimentale de l'innocuité de la toxine ingérée. M. Gibier avait conclu, très vaguement, que « la muqueuse rectale retient les toxines et les antitoxines, si elle ne les détruit pas. Si elle les absorbe, il faut admettre que, transportées au foie, ces substances sont détruites par cet organe ». M. Charrin essaie de démontrer l'action puissante de l'épithelium intestinal et prévoit celle des ferments et des sucs digestifs.

Revenant sur ce sujet avec M. Lefèvre (*Soc. de Biol.*), en 1898, il pense que les sécrétions gastriques sont capables de modifier

la toxine tétanique. Les saprophytes intestinaux agiraient dans le même sens. Il conclut alors qu'il faut voir dans ces faits l'explication de l'innocuité de la toxine tétanique ingérée.

M. Ransom, l'année dernière (*Deutsche med. Woch.*), a constaté qu'on pouvait impunément injecter dans l'intestin du cobaye des doses 100,000 fois mortelles de toxine tétanique. A son avis, la toxine tétanique sort du tube digestif sans être modifiée.

Nencki, Sieber et Schoumow-Siemanowski (*Cent. f. Bakt.*, XXIII, 19) ont étudié eux aussi l'action des divers sucs digestifs sur la toxine tétanique. Ils pensent que chacun d'eux possède une action atténuante ou destructive sur ce poison, mais que le rôle principal, dans cette destruction, est joué par la bile, le suc pancréatique, et surtout par le mélange de ces deux derniers.

Tout récemment, M. Charrin (*Comptes rendus* 1899) vient de revenir sur ces faits et admet aujourd'hui avec M. Metchnikoff que les microbes intestinaux jouent un rôle très important dans l'atténuation ou la destruction des toxines introduites dans le tube digestif.

D'un autre côté, Lacerda, Weir Mitchell, Fayrer, Brinton, Calmette ont démontré qu'on pouvait introduire sans danger, dans l'estomac des animaux, des doses plusieurs fois mortelles de venin. Fraser (*Brit. med.* J. 1895, p. 416), après avoir confirmé les conclusions de ses prédécesseurs, va encore plus loin qu'eux et prétend que « non seulement le venin est inerte quand on l'introduit dans l'estomac », mais encore « qu'il donne aux animaux une certaine immunité », très légère ; il démontre ensuite que c'est la bile qui détruit le venin dans le tube digestif, et il considère la bile comme un véritable antidote du venin.

Gibier, dans les *Archives de l'Institut Pasteur du Connecticut*, en 1896, confirma les conclusions de Fraser.

M. Wehrmann, dans un très consciencieux travail du *Laboratoire de M. le Dr Calmette* et publié dans ces *Annales* (1897 et 1898), a étudié *in vitro* l'action des divers ferments digestifs sur le venin. Il conclut que la ptyaline, la bile, la pancréatine ont sur le venin une action destructive énergique ; la pepsine est de beaucoup moins active, l'oxydase leucocytaire totalement inactive.

Il y a donc sur ce sujet nombre d'affirmations insuffisamment précisées au point de vue expérimental : ce qui n'a rien d'étonnant, étant donné le vague de la question posée et les difficultés toutes particulières de la solution.

Il est très difficile, en effet, d'expérimenter d'une manière précise avec des substances aussi complexes, aussi mal définies, aussi instables que les toxines, les venins et les diastases des sucs digestifs.

Une série d'expériences préliminaires était donc nécessaire pour aborder cette question, et c'est le résultat de ces recherches que nous voulons ici brièvement rapporter.

Nous avons introduit la toxine tétanique ou le venin dans l'estomac des lapins, au moyen d'une sonde urétrale en gomme, bien huilée et glissée avec douceur dans l'œsophage, de façon à éviter la moindre éraillure, celle-ci pouvant entraîner la mort en permettant l'absorption du poison à ce niveau.

Pour plus de précautions, nous faisions couler un peu d'eau dans la sonde après l'introduction des toxines.

En opérant de la sorte, nous avons pu nous convaincre que l'ingestion de la toxine tétanique et celle du venin ne produit aucun accident chez les animaux, quelles que soient les doses ingérées. C'est ainsi que certains lapins ont pu ingérer, en une seule fois, des doses de toxine tétanique plus de 500 fois mortelles; d'autres ont absorbé, en 20 et 30 fois, des doses de la même toxine près de 1,000 fois mortelles. C'est ainsi que certains lapins ont ingéré, en 40 fois, une dose de venin 600 fois mortelle, et que d'autres ont absorbé, en une seule fois, des doses plus de 100 fois mortelles.

Aucun des animaux qui avaient absorbé la toxine tétanique ou le venin ne possédait l'immunité. Que l'ingestion ait eu lieu à petites doses répétées ou à doses massives uniques, les résultats étaient les mêmes. Nos observations à ce sujet ne confirment pas ce qu'avait vu Fraser (d'Édimbourg). Tous nos lapins mouraient en même temps que les témoins, après avoir reçu une même dose de venin sous la peau.

Mais, peut-être, le sérum de ces animaux possédait-il des propriétés antitoxiques?

Pour le savoir nous avons saigné les animaux qui avaient ingéré les toxines, 24 heures, 48 heures, 8 jours, 10 jours après la dernière ingestion. Nous avons fait des mélanges, *in vitro*, de la dose mortelle de toxine tétanique ou de venin avec des quantités variables (1, 2, 3, 5, 10 c. c.) de ce sérum, et nous avons injecté le tout à des animaux neufs.

Aucun des animaux qui avaient absorbé la toxine tétanique ou le venin ne possédait un sérum doué de propriétés antitoxiques, soit pour les sujets de même espèce (lapins), soit pour ceux d'espèces différentes (cobaye, souris blanche).

En résumé, les toxines ne sont nullement nocives pour les animaux qui les ingèrent : et cette ingestion ne donne aucune immunité et ne confère aucune propriété antitoxique au sérum.

D'où cela provient-il ? Ces toxines traversent-elles l'intestin sans être absorbées ? S'il en est ainsi, nous devons les retrouver intactes dans les fèces.

Or, après avoir fait ingérer à des lapins 20 c. c. de toxine tétanique ou 20 c. c. de venin, on lie le rectum.

Le lendemain, on sacrifie les animaux. On recueille le contenu du tractus gastro-intestinal ; on le lave ; on le filtre et on injecte le filtrat à des animaux neufs.

Dans ces conditions, aucun des animaux injectés n'est mort. Il n'y avait donc aucune trace de toxine libre dans le tube digestif.

C'est donc qu'elles ont été absorbées ou détruites.

Elles ne sauraient avoir été absorbées en nature, car alors elles auraient déterminé la mort des animaux.

Elles ont donc été fixées ou détruites.

Par quel mécanisme?

Est-ce une fixation d'ordre physico-chimique analogue à un phénomène de teinture ? ou bien une fixation d'ordre chimique ? ou bien encore une décomposition par une diastase ou un ferment figuré ?

Pour tâcher d'élucider cette question, nous avons opéré *in vitro* à l'aide de liquides rappelant par leur composition celle des sucs digestifs.

Nous avons employé :

1° Solution de ptyaline ainsi formée :

Ptyaline commerciale de Merck	0 gr. 50
Chlorure de sodium }	*ãã* 0 gr. 50
Chlorure de potassium }	
Eau	100 grammes.
Chloroforme	X gouttes.

2° Une solution de pepsine suivant la formule :

Pepsine de Merck	5 grammes.
Acide chlorhydrique ou lactique	2 —
Chlorure de sodium	1 gramme.

Chlorure de potassium........................ 1 gramme.
Eau.. 1 litre.
Chloroforme.................................. XL gouttes.

3° Une solution de pancréatine de Merck :

Pancréatine.................................. 0 gr. 50
Chlorure de sodium.......................... } *àà* 0 gr. 50
— de potassium............................ }
Eau.. 100 grammes.
Chloroforme.................................. X gouttes.

4° De la bile de bœuf recueillie aussi aseptiquement que possible à l'abattoir.

Nous placions dans des verres la dose sûrement mortelle de la toxine tétanique ou de venin avec des quantités variables (10 c. c. ou 20 c. c.) de ces liquides.

Le tout était porté à l'étuve à 40° pendant 24 heures, en même temps qu'un tube de toxine témoin destiné à démontrer que le seul séjour à l'étuve ne suffisait pas pour atténuer celle-ci. Le lendemain, on pratiquait les injections.

Dans ces conditions :

1° La ptyaline détruit totalement l'activité de la toxine tétanique et du venin ;

2° Le suc gastrique artificiel que nous avons employé les modifie considérablement en les détruisant ou en les atténuant dans de très fortes proportions ;

3° La bile les atténue ou même les détruit, mais il faut pour cela une assez grande quantité de cette humeur.

4° La pancréatine atténue manifestement la toxine tétanique sans la détruire : à haute dose elle peut la détruire. Elle détruit, au contraire, même à petites doses, l'activité du venin.

Pour étudier l'action des microorganismes intestinaux, nous avons procédé suivant deux méthodes : *in vivo* et *in vitro*.

a) Nous avons laparotomisé des lapins et lié une anse intestinale de 10 à 15 c. de long ; à travers la ligature supérieure et avant de serrer celle-ci, nous avons introduit dans l'anse, à l'aide d'une seringue de Pravaz, 0,5 c. c. de venin, c'est-à-dire plus que la dose mortelle. On refermait ensuite l'abdomen.

En même temps, on injectait sous la peau d'un témoin la même dose de venin.

Les animaux qui avaient reçu le venin dans l'intestin mouraient à peu près en même temps que les témoins.

Ceci prouve que ni l'épithélium intestinal, ni les microbes de l'intestin ne détruisent le venin.

Pour la toxine tétanique, on ne saurait procéder de la sorte, car il faudrait attendre au moins 48 heures avant que les accidents se déclarent et l'occlusion intestinale tuerait l'animal dans ce délai.

Nous avons donc opéré autrement. 24 heures après l'introduction de la toxine tétanique dans l'anse intestinale isolée, on ouvre de nouveau l'abdomen et l'on retire le liquide restant dans l'anse ligaturée. On filtre sur papier et on injecte aux animaux. Or ces derniers meurent, mais avec un léger retard sur les témoins, qui ont reçu la même dose de toxine pure filtrée sur papier.

Les toxines, après un séjour de 24 heures dans une anse intestinale liée, ne sont que légèrement altérées ; elles peuvent n'être même nullement modifiées.

b) *In vitro,* en plaçant à l'étuve de la toxine tétanique ou du venin mélangés avec des matières fécales de lapin, on constate que, 24 heures après, la toxine tétanique possède une activité sensiblement atténuée ; le venin a conservé au contraire presque complètement son pouvoir toxique.

Puisque, en somme, les microorganismes intestinaux ne font qu'atténuer légèrement l'activité des toxines, faut-il admettre que ce soit l'épithélium intestinal qui joue un rôle destructeur?

Sacrifions un lapin, recueillons aussi aseptiquement que possible une anse intestinale de 10 c. m. de long. Débarrassons-la des matières qu'elle renferme sous un léger courant de sérum artificiel chloroformé et tiède. Lions le bout inférieur. Plaçons dans cette anse 3 c. c. de toxine tétanique ou de solution à 1 0/0 de venin. Fermons au-dessus et plaçons l'anse ainsi préparée dans un tube contenant 10 c. c. d'eau distillée stérilisée et chloroformée. Dans ces conditions, l'intégrité des sucs cellulaires et des diastases est respectée aussi complètement que possible, car nous savons que le chloroforme, surtout à faible dose, n'exerce aucune action destructive sur eux. Mettons le tout à l'étuve à 40°.

Le lendemain, injectons à des animaux le liquide extérieur à l'anse et celui qui y est demeuré.

Nous constatons alors que les toxines ont dialysé, mais qu'en dialysant elles se sont atténuées d'une manière insignifiante.

L'épithélium intestinal ne détruit donc ni la toxine tétanique, ni le venin : il les atténue à peine.

Enfin, en admettant que les toxines traversent intégralement la muqueuse intestinale, les voilà dans le sang : que vont-elles devenir au contact des oxydases leucocytaires?

En suivant le procédé indiqué par Portier, nous avons obtenu des oxydases leucocytaires donnant au contact de la teinture de racine de gaïac la belle coloration bleue révélatrice.

Ces oxydases ont été placés *in vitro* à l'étuve à 40° avec la dose mortelle de venin et de toxine tétanique.

Le lendemain, les mélanges étaient injectés aux animaux.

Nous avons constaté de la sorte que les oxydases leucocytaires atténuent dans des proportions appréciables, mais sans les détruire complètement, la toxine tétanique et le venin.

Si, pour nous résumer, nous jetons les yeux sur le tableau suivant, nous voyons quelle est l'action respective des facteurs étudiés sur les toxines, et nous comprenons pourquoi ces toxines introduites par la voie gastrique sont inactives, pourquoi elles ne donnent pas l'immunité dans ces conditions, pourquoi enfin elles ne confèrent aucune propriété antitoxique au sérum des animaux qui les ingèrent.

AGENT ÉTUDIÉ	ACTION	
	TOXINE TÉTANIQUE	VENIN
Ptyaline	Atténuation considérable.	Atténuation très prononcée.
Suc gastrique	— —	Destruct. presque complète.
Bile	— —	— — —
Pancréatine	Destruction.	Destruction.
Microbes intestin.	Atténuation très légère.	Atténuation très légère.
Epithélium intestinal	Presque nulle.	Presque nulle.
Oxydases leucocyt.	Atténuation notable.	Atténuation notable.

DEUXIÈME PARTIE

DU SORT DES ANTITOXINES INTRODUITES DANS LE TUBE DIGESTIF.

Après l'étude que nous venons de faire relativement à deux types de toxines, l'une d'origine microbienne, l'autre d'origine animale, il importait de savoir si les antitoxines sont elles aussi modifiées ou détruites sous l'action des sucs digestifs, et si l'introduction de ces antitoxines dans le tube digestif est capable de conférer l'immunité.

Jusqu'à présent, très peu d'expérimentateurs se sont occupés de cette question. On a bien essayé d'administrer les sérums dans un but thérapeutique, soit par la voie gastrique (Ferran), soit par la voie rectale (Chantemesse); mais aucune étude expérimentale n'a été entreprise sur le sort des antitoxines introduites dans le tube digestif.

Seul Gibier, dans la note qu'il présenta en 1896 à l'Académie des sciences, affirma que « le sérum antitétanique introduit dans l'intestin des cobayes n'immunise point ces animaux », mais il n'en cherche pas la cause.

Nous avons donc abordé cette question en faisant usage des méthodes qui nous ont servi pour les toxines, et qui ont été précédemment décrites. Il va sans dire qu'elles sont justiciables des mêmes reproches, et que leur valeur n'est qu'approximative; nous les donnons pour ce qu'elles valent.

Et d'abord nous nous sommes aisément convaincus que l'injection de sérum antitétanique ou de sérum antivenimeux n'immunise pas les animaux contre le tétanos ou contre le venin des serpents. — Le résultat est toujours le même, quelles que soient les doses injectées (elles ont varié entre 60 c. c. et 250 c. c.). Ils ont aussi été identiques, que l'injection ait été unique et massive ou qu'elle ait été fractionnée et échelonnée en 1 à 2 mois.

Le sérum des animaux qui avaient ingéré les antitoxines ne possédait aucune propriété antitoxique, ni pour les animaux de même espèce, ni pour ceux d'espèces différentes.

Cependant les antitoxines ingérées ont été absorbées ou détruites, car si on introduit dans l'estomac des lapins, après avoir lié le rectum, 120 c. c. de sérum (antitétanique ou antivenimeux), on constate que 24 heures après il n'en reste plus dans le tube digestif.

Les antitoxines cependant n'ont point été absorbées en nature, puisqu'elles n'ont pas conféré l'immunité : elles ont donc été détruites ou modifiées. Mais par quel mécanisme?

Nous avons suivi ici exactement la même méthode expérimentale que pour les toxines et voici ce que nous avons observé :

1° La ptyaline ne modifie nullement l'activité des sérums antitoxiques.

2° Le suc gastrique artificiel employé ne la modifie pas non

plus. Seul, le sérum antivenimeux a perdu un peu de son activité.

3° La bile de bœuf ne possède aucune action modificatrice sur les antitoxines étudiées.

4° La pancréatine, au contraire, les modifie fortement ou même peut les détruire.

5° Placées pendant 24 heures dans une anse intestinale liée, elles perdent leur activité,

6° Les migro-organismes intestinaux leur font également perdre leur activité.

7° En pratiquant la même expérience que celle qui nous a servi pour étudier l'action de l'épithélium intestinal sur les toxines dans la première partie de ce travail, nous avons pu nous convaincre que ni dans l'anse intestinale liée, ni dans le liquide au milieu duquel cette anse était plongée, il ne restait de sérum antitoxique actif.

L'épithélium intestinal semble donc l'avoir détruit.

Enfin les sérums antitétaniques et antivenimeux ne sont point modifiés au contact des oxydases leucocytaires.

En résumant ces résultats en un seul tableau, on saisit rapidement l'action respective des divers facteurs étudiés.

FACTEURS ÉTUDIÉS	ACTION	
	SÉRUM ANTISEPTIQUE	SÉRUM ANTIVENIMEUX
Ptyaline...........	Presque nulle.	Nulle.
Suc gastrique.....	Nulle.	Presque nulle.
Bile...............	Presque nulle.	Presque nulle.
Pancréatine.......	Très notable.	Très notable.
Microbes intestin..	Très notable.	Très notable.
Epithélium intestinal	Destruction.	Destruction.
Oxydases leucocyt.	Nulle.	Nulle.

Bien que la complexité des substances (toxines et antitoxines) que nous avons étudiées dans ce travail soit considérable, nous pensons que les expériences ci-dessus relatées permettent de mieux comprendre pourquoi les toxines et les antitoxines introduites dans le tube digestif perdent leur activité.

Nous estimons cependant que l'étude de cette question appelle de nouvelles recherches.

ESSAI SUR L'EMPLOI DES MATIÈRES COLORANTES

POUR LA RECHERCHE DES EAUX D'INFILTRATION

Par M. A. TRILLAT

L'emploi des matières colorantes et de la fluorescéine pour la recherche de l'origine des cours d'eau et de leurs relations n'est pas nouveau. Cependant, on peut être surpris que ce procédé se soit si peu généralisé.

J'ai pensé que cet état de choses pouvait provenir de l'ignorance des conditions dans lesquelles on devait se placer pour appliquer efficacement la méthode.

Une expertise ayant eu pour objet la recherche de l'origine d'une eau m'a fourni l'occasion d'étudier cette question ; je crois utile de publier le résultat de mes observations.

Les exemples relatés dans les diverses revues scientifiques concernant les recherches d'eaux effectuées au moyen des colorants sont peu nombreux.

Une remarquable expérience couronnée de succès fut tentée en 1877 par Kop pour établir la relation qui existait entre les eaux du lac de Constance et les deux fleuves voisins, le Rhin et le Danube. 10 kilos de fluorescéine furent jetés dans le Danube entre Mœhringen et Immendingen : après 60 heures, on vit la fluorescence apparaître dans l'Ach, l'un des affluents du lac : le phénomène dura 36 heures.

MM. Forel et Goliez rapportent des expériences tentées le 3 décembre 1892 pour rechercher les relations entre les eaux du lac Brenet et la source de l'Orbe. 1 kilog. de violet d'aniline, dissous dans l'eau acidifiée par de l'acide acétique, fut jeté dans l'entonnoir de Boussort : une surveillance attentive fut établie à la source de l'Orbe; le débit de l'entonnoir était de 200 litres par seconde; celui de l'Orbe de 2,000 litres. Aucune coloration ne put être constatée.

La même expérience fut répétée par M. Paccard, en remplaçant le violet d'aniline par la fluorescéine; il jeta la solution colo-

rante dans les entonnoirs de Boussart : les premiers phénomènes de coloration parurent 50 heures après dans la rivière de l'Orbe dont l'origine put être ainsi définitivement établie.

Après ces exemples, et d'autres que je pourrais citer, je crois intéressant de signaler le résultat de l'expérience suivante.

La municipalité d'une ville importante des environs de Paris avait fait construire une galerie filtrante juxtaposée pour ainsi dire le long de la Seine. Au moyen d'une pompe élévatoire, l'eau filtrée était distribuée dans la ville.

Or l'analyse chimique de deux prélèvements d'eau, l'un effectué chez l'habitant, l'autre en pleine Seine, démontra que la composition des deux échantillons était différente. Les prélèvements faits dans divers points de la ville confirmèrent les premiers résultats : cette eau se distinguait de l'eau de Seine par un degré hydrométrique beaucoup plus élevé. Il s'éleva à ce propos un procès curieux entre les habitants, d'une part, et la municipalité qui s'était engagée à fournir de l'eau de Seine filtrée.

A ce sujet, les suppositions les plus invraisemblables surgirent, notamment celle de la désagrégation des matériaux de la galerie filtrante.

Désigné comme expert pour étudier cette question, après avoir constaté la différence de composition chimique entre les deux eaux, je parvins à identifier partiellement l'eau prélevée chez l'habitant avec l'eau d'une source située à environ 600 mètres de la galerie filtrante. Une vive polémique s'étant engagée, je tentai de démontrer d'une manière plus palpable la relation qui existait entre les eaux de la source et l'eau distribuée en ville.

Une solution ammoniacale de 100 gr. de fluorescéine fut jetée en une seule fois dans un puits communiquant avec la source. Quelques heures après, je commençai à prélever des échantillons d'eau en ville, que je comparai avec le prélèvement type effectué avant l'addition de fluorescéine. Au moyen du *fluorescope* décrit plus loin, je parvins à distinguer après 10 heures la fluorescence de l'eau, parfaitement invisible à l'œil nu à ce moment. Elle ne devint apparente en ville qu'après 24 heures.

Je pus donc ainsi démontrer que la galerie filtrante avait été construite sur une nappe d'eau souterraine, et qu'elle ne recueillait en grande partie que l'eau calcaire de la source, quoi-

qu'elle ne fût placée qu'à une dizaine de mètres de la Seine.

A côté de ces essais effectués avec la fluorescéine, on peut citer un certain nombre d'expériences tentées avec de la fuchsine, et dont la plupart donnèrent des résultats négatifs, ce qui n'a pas lieu d'étonner, la fuchsine étant, comme on le verra plus loin, facilement décolorée par les eaux calcaires.

Il était à supposer que la nature de l'eau soumise aux expériences ou que la filtration des solutions colorées à travers des terrains sablonneux, argileux, calcaires ou tourbeux pouvaient avoir comme résultat de décolorer partiellement ou même totalement certaines couleurs.

Il était surtout important d'examiner l'action des matières ammoniacales sur les solutions colorées. de manière à savoir si le procédé était applicable à la recherche des infiltrations des fosses.

Pour élucider ces questions, j'ai d'abord déterminé la valeur comparative des principaux colorants dans l'eau distillée et dans diverses eaux. J'ai ensuite examiné l'influence de la nature des sols et des produits ammoniacaux sur les solutions colorées. Enfin, j'ai cherché quel pourrait être le meilleur mode d'emploi des matières colorantes, au moyen d'un dispositif spécial.

INFLUENCE DES EAUX

Les matières colorantes expérimentées sont les suivantes : auramine, safranine, rouge congo, fuchsine neutre, éosine, vert malachite, violet de Paris, bleu méthylène et fluorescéine. Comme couleur acide, j'ai choisi la fuchsine sulfonée.

Pour déterminer proportionnellement l'intensité de coloration dans l'eau distillée, elles ont été préalablement purifiées et séchées plusieurs jours à une température de 90°. Les observations ont été faites sur un litre d'eau, dans des flacons en verre blanc de 7 centimètres de diamètre intérieur.

Les dissolutions colorées au 1/100000 sont encore intenses. A la dose de 1/1000000, elles sont toutes plus ou moins appréciables. mais à une dilution 50 fois plus faible, soit à la dilution de 1/50000000, l'éosine, l'auramine et la fuchsine acide deviennent invisibles. Les autres couleurs, à part la fluorescéine, deviennent difficilement appréciables. On peut les disposer ainsi, par ordre décroissant d'intensité pour cette dose de

1/50000000 : fluorescéine, vert malachite, bleu méthylène, violet, fuchsine neutre, safranine, rouge congo.

Si l'on remplace l'eau distillée par de l'eau marquant 15° hydrométriques, on peut observer que les solutions au 1/1000000 sont encore visibles après 24 heures, mais avec une eau marquant 40° et riche en carbonates, la décoloration est totale pour les couleurs suivantes : auramine, fuchsine acide et neutre, vert malachite et violet; elle est atténuée, mais encore visible pour le rouge congo, l'éosine. Enfin la safranine et le bleu de méthylène ont été les couleurs les moins influencées par la présence des sels calcaires en dissolution dans l'eau. La fluorescéine perd un peu de sa fluorescence : cela peut être attribué à un léger précipité formé dans l'eau.

J'ai constaté que si l'observation de la fluorescence a lieu dans une eau contenant des matériaux en suspension ou même dans une eau très légèrement trouble, le dichroïsme devient difficilement décelable. Il est donc nécessaire, dans ce cas, de filtrer l'eau afin d'avoir un liquide clair et transparent.

On peut donc conclure que la plupart des matières colorantes sont précipitées en bases par les sels calcaires des eaux.

INFLUENCE DES TERRAINS

Il peut arriver que les eaux sur lesquelles on doit expérimenter filtrent à travers des sols de natures diverses. On peut se demander dès lors si les solutions colorées seront modifiées ou arrêtées et si on pourrait régénérer leur coloration.

Pour étudier cette question, j'ai préparé des solutions de matières colorantes au 1/1000000, et je les ai filtrées à travers des couches de sols de composition différente. La couche dont la composition correspondait à la nature du sol à étudier était placée dans une allonge, de manière à former une épaisseur de 30 centimètres; la solution colorée était ajoutée goutte à goutte et recueillie après la filtration.

J'ai expérimenté des sols calcaires, sablonneux, argileux et tourbeux, correspondant à la composition centésimale suivante :

	Matière organique.	*Argile.*	*Carbonate.*
Sol calcaire.........	0	6.090	73.80
Sol argileux.........	7.94	79.20	
Sol tourbeux.........	49.07	35 »	
Sol sablonneux	4.56	0	

Le sol calcaire a décoloré entièrement toutes les solutions, sauf la fluorescéine. Les solutions filtrées restent incolores par une addition d'acide acétique, excepté la fuchsine acide, dont la coloration rouge réapparaît.

Les sols argileux et sablonneux laissent passer les solutions colorées, mais dans un état plus ou moins affaibli.

Le sol tourbeux a décoloré toutes les dissolutions, y compris celle de la fluorescéine. La fuchsine acide, comme dans le cas précédent, a pu cependant être régénérée.

Des résultats analogues ont été obtenus en filtrant les solutions colorées à travers des couches de terre de jardin légère et de terre arable.

Les matières colorantes sont donc précipitées en base incolore par les sels calcaires, et la base précipitée se trouve arrêtée dans le sol : la fuchsine acide (il doit en être de même des autres couleurs sulfonées) est décolorée et transformée en base soluble qui n'est pas arrêtée. Il en résulte que, pour ce dernier cas, l'addition d'acide acétique régénère la coloration.

Je me suis servi du même procédé pour me rendre compte de l'action de l'ammoniaque libre et des sels ammoniacaux. Pour cela, j'ai utilisé le fumier de ferme, qui a été disposé en couches de 40 centimètres de hauteur. Les résultats sont analogues aux précédents : la fuchsine acide a pu être régénérée et la fluorescéine a pu être décelée facilement, après avoir eu soin de clarifier le liquide. — Le tableau de la page 449 résume les résultats observés.

L'intensité de coloration des solutions varie donc beaucoup, non seulement selon les eaux, mais surtout selon la nature des sols.

En me basant sur la propriété que possède la fluorescéine, d'être rendue plus visible lorsqu'on observe sa solution contre une surface noire, j'ai imaginé un dispositif qui permet de la reconnaître à des doses infiniment faibles. L'appareil se compose de deux tubes en verre blanc disposés verticalement et à la même hauteur le long d'un support, au moyen de deux pinces. Ils ont une longueur de $1^{m},20$, sur une largeur de 2 centimètres, et sont ouverts à la partie supérieure, tandis que la partie inférieure est fermée par un bouchon dont la face interne a été préalablement passée au vernis noir. Plus simplement, on

TABLEAU DES ESSAIS

MATIÈRES COLORANTES EMPLOYÉES :

FLUORESCÉINE, VERT MALACHITE, BLEU MÉTHYLÈNE, VIOLET DE PARIS, SAFRANINE, FUCHSINE NEUTRE, FUCHSINE ACIDE, ÉOSINE, ROUGE CONGO, AURAMINE

DILUTION des COLORANTS	EAU DISTILLÉE ET EAU à 15° hydrotim.	EAU à 40° HYDROTIM.	SOL CALCAIRE	SOL ARGILEUX ET SABLONNEUX	SOL TOURBEUX	FUMIER DE FERME	TERRE ARABLE et TERRE DE JARDIN
Millionième.	Visibles.	Après 24 heures, fluorescence très visible. Décoloration totale pour auramine, fuchsine neutre et acide, vert malachite. Décoloration partielle pour safranine, rouge Congo, éosine.	Fluorescence atténuée. Décoloration pour les couleurs. La fuchsine acide est régénérée par addition d'acide acétique.	Atténuation de coloration dans toutes les solutions.	Décoloration totale pour toutes les matières colorantes y compris fluorescéine. Par acidification, régénération de la fuchsine acide.	Fluorescence nettement appréciable, mais après clarification du liquide filtré. La fuchsine acide peut être régénérée par acidification. Décoloration totale pour toutes les autres matières colorantes.	Résultats semblables à ceux donnés sur le sol calcaire.
Dix-millionnième.	Visible.						
Cinquante-millionnième.	Fluorescéine visible. Les autres couleurs très atténuées par ordre décroissant : vert malachite, bleu violet, fuchsine neutre, safranine, rouge Congo. Eosine, auramine et fuchsine acide invisibles.						
Cent-millionnième.	Invisible sauf fluorescéine.						
Cinq cent-millionnième.	Id.						
Deux-milliardième.	Fluorescence visible seulement au fluorescope.						

peut disposer sur cette face un petit disque de papier noir glacé.

Si l'on remplit ces deux tubes jusqu'à un centimètre du bord, l'un avec de l'eau naturelle, l'autre avec cette même eau contenant des traces de fluorescéine, on peut observer, en plaçant

l'œil dans l'axe de chaque tube, que l'eau naturelle se projette suivant une couleur bleu sombre, tandis que l'autre a une teinte vert clair. Cette différence se manifeste pour une solution dont la fluorescéine n'est plus visible à l'œil sans cet appareil.

La limite de la visibilité de la fluorescéine étant environ de 1/200000000, le fluorescope permet de décupler cette visibilité en sorte qu'elle peut être évaluée à 1/2000000000, soit 1 gramme de fluorescéine dans 2 mille mètres cubes d'eau.

On peut donc tirer profit de l'emploi de cet appareil dans le cas où la fluorescéine aurait été invisible à l'œil nu. Il permet en outre de reconnaître la fluorescence longtemps avant la visibilité normale : il pourra ainsi donner des renseignements plus exacts sur la vitesse du débit des eaux.

Dans l'application de la méthode, on pourra suivre la marche suivante. La fluorescéine sera dissoute dans l'alcool additionné d'un peu d'ammoniaque : quant à la quantité à employer, elle peut être variable selon les circonstances, et il est difficile de fixer une limite à ce sujet.

Un prélèvement de l'eau à examiner sera effectué avant l'addition de la fluorescéine, et le liquide sera placé dans l'un des deux tubes de l'appareil. Après l'addition de la matière colorante et après un premier laps de temps variant suivant les distances, de nouveaux prélèvements seront faits toutes les deux heures, par exemple, et examinés comparativement au prélèvement type.

Voici comment on pourrait résumer les résultats que j'ai obtenus dans mes expériences :

(*a*) Les matières colorantes autres que les couleurs sulfoconjuguées, telles que la fuchsine acide et la fluorescéine, sont à rejeter.

(*b*) Avant l'addition de la matière colorante, il sera nécessaire de déterminer la nature du terrain : j'ai démontré plus haut qu'elle avait une grande influence sur l'intensité de la coloration qui peut même devenir nulle dans certains cas.

(*c*) Il est impossible de donner une indication précise sur la quantité de fluorescéine ou de fuchsine acide à employer : elle est subordonnée à l'importance des cours d'eau, de la composition des terrains, des nappes souterraines, de la distance à franchir, etc. La dose de 100 grammes de fluorescéine peut déjà

donner des résultats dans beaucoup de cas, comme dans l'exemple que j'ai relaté ; la dose de 1 kilo est énorme, car elle peut être, par l'emploi du fluorescope, décelée dans la dilution d'environ deux millions de mètres cubes.

(*d*) La fluorescéine sera dissoute dans de l'alcool additionné d'environ 5 0/0 d'ammoniaque.

(*e*) Les eaux de vidanges, le passage à travers des fosses ou du fumier, atténue la fluorescence : la fuchsine acide est momentanément décolorée, mais sa couleur réapparaît par addition d'acide acétique. Il s'ensuit que son usage peut être utilisé dans ces cas, même conjointement avec celui de la fluorescéine.

USAGES

Outre la recherche de l'origine des sources, on peut se servir des solutions des colorants pour établir les relations entre deux cours d'eau ou entre des lacs, pour l'étude des glaciers et, en général, pour les études géologiques.

Étant donnés la quantité de fluorescéine employée, le temps nécessaire pour apercevoir au fluorescope la première fluorescence, le moment où la fluorescence devient la plus intense et la durée du phénomène, on peut avoir, sinon une idée exacte, du moins la notion du volume d'une source, de sa vitesse, de l'existence et de l'importance des nappes d'eau souterraines.

Dans l'hygiène, on peut s'en servir pour reconnaître, comme cela a déjà été fait, les fuites d'eau dans les canalisations douteuses, et *vice versa*, pour reconnaître dans ces mêmes canalisations les infiltrations extérieures. En temps de contamination, l'emploi combiné de la fluorescéine et de la fuchsine sulfonée, dont les propriétés colorantes, ainsi que je viens de le démontrer, ne sont pas entièrement détruites par les matériaux de la décomposition, pourra rendre les plus grands services pour découvrir les infiltrations et les suintements provenant des fosses des maisons ou des quartiers contaminés.

Dans l'industrie, on pourrait souvent avoir recours aux colorants pour les questions, si controversées par les intéressés, des infiltrations des eaux résiduaires provenant des établissements classés.

FERMENTATION DES FIGUES DE BARBARIE

Par E. ROLANTS

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Lille.

Le figuier d'Inde ou de Barbarie (*Cactus opuntia*) est très abondant dans la zone méridionale de l'Europe et dans les pays barbaresques. On le trouve aussi en grandes quantités au Mexique. A cause des épines nombreuses qui garnissent ses tiges, il sert surtout à former des haies dans ces pays. Il peut se cultiver avec la plus grande facilité. Le travail que nécessite son entretien est insignifiant. Ses fruits contiennent une assez forte proportion de sucre fermentescible. On peut donc se demander pourquoi, malgré l'avis de nombreux auteurs, on n'en retire pas encore l'alcool qu'ils seraient capables de fournir ; d'autant plus qu'après distillation, ces fruits laissent un résidu qui est très susceptible d'être employé pour l'alimentation du bétail.

Le seul travail que nous connaissions sur la figue de Barbarie a été publié, en 1876, par M. Balland, alors pharmacien militaire en Algérie[1]. Cet auteur relate d'abord 3 essais de fermentations faites en laissant agir sur le suc les espèces de levures qui se trouvent naturellement sur les fruits.

Dans le 1er essai, il abandonna à la fermentation 11 kilos de suc obtenu par pression de 33 kilos de fruits (soit 33 0/0). Ce suc contenait 128 grammes de sucre réducteur par litre et, après fermentation complète du sucre, 4,2 d'alcool pour 100 parties de suc. L'acidité s'accrut de façon considérable : de 2 gr. 8 par litre (en ac. sulfurique) avant fermentation, elle monta à 7 gr. 8 après fermentation.

Dans le 2e essai, 21 kilos de figues donnèrent 10 kilos de suc (soit 48 0/0). Le suc contenait 145 grammes de sucre réducteur par litre et après fermentation 4,2 d'alcool pour 100 parties de suc. L'acidité arriva de même à 8 gr. 4 par litre.

Dans le dernier essai 6 kil. 8 de figues lui donnèrent 4 kil. 1 de suc (soit 60 0/0). Les 140 grammes de sucre réducteur par

1. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1876.

litre donnèrent 45 c. c. d'alcool. L'acidité alla aussi de 1 gr. 4 à 8 gr. 5 par litre.

Cette augmentation considérable de l'acidité est, sans aucun doute, l'œuvre des nombreuses espèces de bactéries qui envahissent ces sucs. Certaines de ces bactéries produisent aux dépens du sucre une fermentation mannitique qui influe très fortement sur le rendement. Pour les combattre, M. Balland a essayé d'ajouter au suc une faible quantité de tannin, d'acide sulfurique ou d'acide chlorhydrique. C'est avec ce dernier, à la dose de 5 grammes par litre, qu'il obtint les meilleurs résultats. Le rendement pouvait être établi de la façon suivante : 1.000 litres de suc fermenté, provenant de 1,500 kilos de figues, donnent 70 à 75 litres d'alcool à 85°, ou 59 à 64 litres d'alcool à 100°, soit 39 à 43 litres d'alcool à 100° pour 100 kilos de fruits.

M. Lebon, ancien ministre des Colonies, et M. Vivier de Steel, ont bien voulu adresser à notre Institut une petite quantité de figues provenant d'Algérie, en nous priant de reprendre cette étude.

La composition des figues de Barbarie est très variable suivant la maturité et surtout suivant les espèces. Les fruits que nous avons reçus étaient relativement pauvres en sucre. Voici la moyenne de plusieurs analyses pour 100 grammes :

Eau	84,65
Sucre interverti	10.00
Acidité (en ac. sulfurique)	0,036
Cendres	1,057
Matières pectiques	1,573
Matières extractives	2,614

Il n'y a pas d'amidon ni aucune substance capable d'être saccharifiée par les acides. L'acidité très faible est due à la présence de traces d'acide acétique et d'un acide fixe que nous n'avons pas déterminé.

Le principal inconvénient que présente l'emploi de ces fruits est la présence de ces matières pectiques, qui oblitèrent complètement les filtres et rendent l'obtention de liquides clairs très difficile. On peut les insolubiliser en portant le suc 20 minutes à 120°, la pression et la filtration deviennent alors faciles. L'ébullition permettrait vraisemblablement d'atteindre le même but.

Nous avons essayé d'extraire le suc par pression, mais les matières pectiques en retenaient une telle quantité que, pour éviter de trop grandes pertes, nous avons préféré délayer, après pressage, la pulpe avec de l'eau, de façon à obtenir, en liquide, le poids des fruits employés. Après stérilisation, puis filtration du liquide obtenu, nous avons mis en fermentation avec

1° La levure Logos de M. Van Laer ;

2° Une levure de vin d'Espagne ;

3° Une mycolevure trouvée sur ces figues.

Après 9 jours de fermentation nous avons obtenu pour 100 parties de fruits.

	TÉMOIN NON FERMENTÉ	N° 1. LEVURE LOGOS	N° 2. LEVURE D'ESPAGNE	N° 3. MYCOLEVURE DE FIGUES
Densité	1,0380	1,0019	1,0019	1,0260
Sucre (en glucose)	9,43	0,50	0,50	6,41
Alcool	—	4,14	4,15	0,88
Acidité (en acide sulfuriq.)	0,047	0,12	0,13	0,10

Le rendement est donc de 41 lit. 5 d'alcool à 100° pour 1,000 kilos de fruits.

Une autre expérience faite dans les mêmes conditions avec

1° Une levure de vin de Champagne ;

2° Une levure apiculée de vin de Champagne ;

3° Une levure de distillerie de grains,

a donné après sept jours de fermentation.

	TÉMOIN NON FERMENTÉ	N° 1. LEVURE DE CHAMPAGNE	N° 2. LEVURE APICULÉE DE CHAMPAGNE	N° 3. LEVURE DE DISTILLERIE DE GRAINS
Densité	1,0400	1,0100	1,0130	1,0100
Sucre (en glucose)	9,46	0,687	1,221	0,737
Alcool	—	4,15	3,8	4,10
Acidité (en acide sulfuriq.)	0,015	0,16	0,19	0,18

Le rendement est analogue au précédent.

Les figues de Barbarie contiennent en général plus de sucre fermentescible que les fruits que nous avons employés. M. Balland a étudié des sucs contenant jusqu'à 14 gr. 5 de sucre pour 100 grammes de fruits; on nous a même assuré que certaines espèces du Mexique étaient encore plus riches.

Nous croyons donc qu'il serait avantageux de cultiver le figuier de Barbarie, du moins les espèces donnant des fruits contenant une grande proportion de sucre. On pourra découper les fruits en cossettes avec des appareils analogues à ceux qui servent en sucrerie pour la betterave, ou pour la fabrication du cidre de pomme en Normandie, en extraire le suc par pression, et reprendre le marc avec une certaine quantité d'eau, de façon à avoir en volume le poids des fruits employés. On fera bouillir le liquide ainsi obtenu et on l'ensemencera avec une levure pure, de préférence en cuves métalliques fermées, qui permettent un travail antiseptique.

L'alcool fourni par les figues de Barbarie est de très bonne qualité. Il renferme, à l'état de flegmes, des éthers aromatiques à odeur agréable, qu'il est, du reste, facile de séparer par rectification.

En résumé, nous pensons que :

1° Les figues de Barbarie peuvent être employées avec avantage industriellement à la fabrication de l'alcool;

2° Qu'elles peuvent fournir un rendement de 40 à 60 litres d'alcool à 100° pour 1,000 kilos de fruits, suivant la richesse de ces fruits en sucre fermentescible;

3° Que la culture du figuier de Barbarie dans un terrain *inapte à toute autre exploitation* peut être rémunératrice. Si nous en croyons le Dr de Vera y Lopez [1], cette culture est très productive. Un figuier peut fournir de 100 à 200 kilos de fruits par an; on peut cultiver 90 pieds par hectare, ce qui permet d'obtenir une récolte de 9 à 18,000 kilos de fruits, pouvant donner de 360 à 720 litres d'alcool à 100°. Le chiffre de 360 étant donné pour les espèces à rejeter, on peut donc dire que l'hectare produirait facilement de 540 à 720 litres d'alcool à 100°.

1. *Tratado de fabricacion de aguardientes y alcoholes*, Madrid, 1885.

LES CHLOROPHYLLES
ET LES CHLOROPHYLLES DE FOUGÈRES

Par M. ÉTARD

Si les pigments chlorophylliens sont encore l'objet de discussions obscures et si beaucoup de savants persistent à admettre une seule chlorophylle pour tous les végétaux, cela tient assurément au nombre trop restreint des analyses et des données spectrales qui ont été publiées.

Non seulement il existe plus d'une chlorophylle dans la nature, mais souvent il en existe plusieurs dans une même plante, comme je le montrerai plus loin. Le nombre des chlorophylles est bien plus grand que celui des espèces botaniques, car dans chacune d'elles les chlorophylles sont affectées aux travaux nécessaires à la plante, à la synthèse des nombreux matériaux que nous lui voyons produire.

Avant de donner les preuves expérimentales qui se trouveront plus loin, qu'il me soit permis de dire comment je comprends le rôle de ces chlorophylles, afin de rendre par la suite plus compréhensible un travail analytique exposé, sans cela, à paraître dépourvu de cohésion.

A l'origine, dans la graine, existe le germe, né avec ses cotylédons dans un ovaire saturé de chlorophylles et ayant pu par ce contact en emporter une parcelle élémentaire. Cet embryon, de nature protoplasmique lors de la germination, ne montre pas de chlorophylles visibles, mais possède cependant le pouvoir d'évoluer, de solubiliser les amyloïdes, les acides gras et les albumines des cotylédons pour les insolubiliser sous d'autres formes dans la plantule.

Fut-il préexistant et latent, le grain chlorophyllien ne joue en fait un rôle certain qu'après l'accomplissement des importants travaux de la germination. Belzung [1] a d'ailleurs montré,

1. Belzung, Phénomènes amylochlorophylliens, *Journal de Botanique*, 1895.

par ses études de cytologie, que le grain chlorophyllien procède de la masse protoplasmique. Dans les végétaux, exactement comme dans les animaux, la puissance de mutation chimique peut donc résider dans le protoplasme dépourvu de chlorophylles apparentes. D'ailleurs les ferments, les champignons et les parasites tels que les cuscutes et même les orobanches ne laissent aucun doute à cet égard. Il y a lieu de rappeler seulement que le germe des plantes vertes vit de la même façon à ses débuts. Ce que le protoplasme ne fait pas seul chez les végétaux supérieurs, c'est la synthèse chimique, l'accumulation de la matière organique destinée à nourrir les animaux. Un germe primitif très petit, à éléments protoplasmiques, préside donc avant les chlorophylles à l'évolution. Il procède d'un ascendant exactement semblable qui a déposé en lui toutes les consignes héréditaires de morphologie, de choix d'habitat, de durée et de méthodes chimiques. Ces parcelles spécifiques se succèdent, comme le voulait l'ancienne théorie de l'emboîtement des germes rajeunie et désignée sous le nom de théorie de Weissmann.

Si les chlorophylles ne jouent pas de rôle au début de la vie, il ne paraît pas douteux qu'une trace de la matière qui doit les former en se trouve parmi les fonctions latentes du germe où toute la vie future est prévue et condensée.

Quoi qu'il en soit, les corps chlorophylliens apparaîtront à leur temps quand les réserves seront épuisées pour assurer la vie autonome. Chaque cellule est alors formée de deux éléments. Le protoplasma, le plus ancien représentant de la vie, travaille à la façon des cellules incolores. Le grain chlorophyllien est une algue venue postérieurement jouer le rôle de glande respiratoire par son action opto-chimique sur l'acide carbonique. L'ensemble de la cellule vit sous le régime symbiotique à la façon des lichens.

A première vue, le protoplasma qui conserve ses propriétés comme s'il était seul, et le grain chlorophyllien bien délimité comme un corps étranger dans la cellule, n'ont pas d'interaction compréhensible. Ils en ont cependant par suite de la variété des instruments chlorophylliens.

D'après les idées en cours, la « chlorophylle » fixe $CO^2 + H^2O$ en éliminant O^2 ; elle retient donc $(CH^2O)^n$, et déverse dans le suc

cellulaire les sucres ainsi créés, bons à servir dans tous les actes chimiques de la plante.

Cette théorie simple ne tient pas compte entre autres choses de ce fait que le grain chlorophyllien est dans son ensemble l'élément *gras* de la cellule, et que la « chlorophylle » a toujours été décrite comme une matière cireuse ou graisseuse, en tout cas *insoluble* dans les milieux aqueux. Comment cette graisse absorberait-elle de l'eau et CO^2 pour faire, en passant par le formol, du sucre s'écoulant à l'état de solution aqueuse ?

Le germe contenant toutes les règles de l'évolution, et capable de reproduire les espèces que faisait la plante mère, contient aussi les embryons des molécules chimiques, leurs noyaux fondamentaux et la loi de leurs dédoublements.

Ces types moléculaires de la première heure se multiplient avec les matériaux très concentrés de la graine qui, liquéfiés d'abord, se précipitent sur eux par coagulation, ou par un phénomène comparable à l'accroissement des cristaux qui, dans un milieu complexe, n'attirent à eux que des molécules de leur propre symétrie. Dans les théories de synthèse les plus connues, trois corps simples seulement retiennent l'attention : $C + O + 2H$: il semble que Az, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Cu, Si, Na ne viennent qu'ensuite par surcroît. Il est impossible en fait d'avoir des graines exemptes de ces corps, et le germe ne parcourra jamais le cycle qui doit le reproduire un jour si le sol a été privé artificiellement des éléments chimiques, peu abondants mais nullement secondaires, cités plus haut.

Les théories sur la synthèse de combinaisons ternaires ne conduisent, par des hypothèses, qu'à des réactions finales, et comme sur ce terrain hypothétique c'est un progrès de faire intervenir *tous* les agents dont la nécessité est démontrée, mieux vaut en élargir la base.

A ce point de vue, il faut surtout retenir la basicité forte des radicaux albuminoïdes, c'est-à-dire protoplasmiques, et la coagulation ou précipitation de ces substances les unes par les autres[1]. Dès que l'ébranlement germinatif se produit, les matériaux quaternaires (C, H, O, Az,) et même plus complexes (C, H, O, Az, P, S, K...) solubilisés un instant, se déposent sur les

1. Drechsel, *Berichte*, t. XXIII, 3096. Kossel, *Zeitchr. fur physiol. Chem.* t. XXII et XXV.

matériaux qu'on pourrait appeler *biomorphiques* du germe. Quittant la vie statique de graine en repos, la plante reprend son état dynamique. Il n'y a jusqu'à présent que le déplacement connu de tout temps de la même matière; je m'efforce seulement de l'expliquer à un autre point de vue. Si la plante cultivée dans un sol artificiel ne trouve pas les éléments P, Az, K, S, Cl..... elle n'atteindra qu'un poids très limité et l'on pourrait presque compter dans quel espace se trouvent répartis les atomes contenus dans la graine originelle ou combien d'atomes (P, Az, K, S, Cl.....) il y a par cellule.

Si le sol fait son apport normal de corps simples et dans ce cas seulement on peut essayer de raisonner sur la synthèse ternaire (C, H, O). Celle-ci s'accomplit surtout dans le grain chlorophyllien. Il est bien fâcheux que les travaux d'anatomie du grain en question aient tenté si peu de chercheurs. Autant qu'on peut se le représenter, cet organe-algue fonctionne comme une sorte de glande en grappe ayant des éléments protoplasmiques propres, en relation avec ceux de la cellule, au moins par le suc cellulaire qui sert de milieu commun.

La minime quantité de matière verte, son énorme pouvoir colorant que j'ai pu constater au delà du $\frac{1}{1,000,000}$ comparé à la masse des corpuscules verts, peu colorés individuellement, montre que bien peu de molécules chlorophyliennes relativement assurent le travail opto-chimique des plantes. Il paraît difficile de savoir comment se trouve répartie la matière verte. Ce que j'ai bien vu, c'est que divers dissolvants sont nécessaires pour décolorer le corpuscule-algue et le réduire à son squelette protoplasmique incolore. En même temps, sous le microscope, on voit par l'action des dissolvants sortir du grain qui se dégonfle une forte quantité de matières provoquant dans le liquide retenu sous la lamelle des stries d'inégale densité. Par cette observation on reconnaît directement que le grain vert est le siège de la formation des graisses, cires, carbures.

Les analyses de cendres faites par Hoppe-Seyler et M. A. Gautier sur la chlorophylle qu'ils ont préparée montre la présence d'éléments minéraux variés dans cet organe chimique de synthèse.

Dans les chlorophylles les plus pures que j'ai obtenues, et même après dissolution dans l'éther et le pentane secs, on trouve

selon les espèces P, K, Cl, S, Fe, et très probablement Al et Cu. Cela fait légitimement penser que, même en se limitant à la synthèse ternaire, les molécules chimiques de chlorophylles utilisent à tout instant ces éléments.

M. G. Bertrand a montré récemment que de minimes quantités de sels organiques de manganèse, métal fréquent dans les plantes, jouent spécialement le rôle d'agents oxydants vis-à-vis des combinaisons du carbone.

L'algue chlorophyllienne sortie du protoplasma est dans son genre semblable à une hématie; elle fixe le carbone mais prend, transporte, cède et libère l'oxygène sans que rien indique une formation nécessaire d'aldéhyde formique.

Le protoplasma blanc ou pigmenté a les racines basiques des albumines vues par Kossel. Il peut fort bien introduire l'acide carbonique dans ses molécules par carbonatation directe sur l'azote et transformation ultérieure. Mais sans rechercher le rôle des éléments autres que C, H, O, il me paraît utile de dire que de de simples carbures C, H, ou des poly-alcools peuvent fixer, au moins quand ils sont fortement *lacunaires*, divers éléments.

Le cyclopentadiène (A. Etard et P. Lambert, *Compt. rend.*, t. CXII, p. 945) a pour formule C^5H^6 et a été représenté depuis par la formule développée

```
H C — C H
 ||    ||
H C    C H
   \  /
    C
    H²
```

Ce carbure agité avec une solution de SO^2 donne un corps $C^{10}H^{16}O^6S^2$ cristallisé, blanc, infusible, non volatil. Il se polymérise à partir du moment où il a été distillé et devient $C^{10}H^{12}$.

L'œnocarpol de vigne, $C^{26}H^{37}(OH)^3 + H^2O$ fixe directement KOH et rend des cristaux de $C^{26}H^{37}(OH)^3KOH.H^2O$ assimilable à un pentaalcool par sa stabilité (A. Etard. *C. R.*, t. CXIV).

Ces deux faits entre autres mettent en évidence l'action de S et de K sur les lacunes chimiques.

Quel que soit pour les chlorophylles le mécanisme de fixation des mailles CH, OH, COH... par une sorte de plastification biomorphique, il n'en reste pas moins à expliquer comment la

« chlorophylle » insoluble et cireuse est à la fois en communication avec les milieux aqueux d'une part, et avec les huiles, cires, résines, carbures... dont peu de végétaux semblent exempts.

Ce rôle est contradictoire mais il ne l'est que par suite de l'hypothèse de la « chlorophylle » unique, et Pringsheim, agitant la question de savoir si cette matière était réellement unique, admettait qu'elle pouvait être dissoute dans un corps gras (c'était le lipochlore). L'historique de cette question est résumé dans le livre de Tschirch (*Untersuchungen uber das Chlorophyll*. P. Parey, Berlin, 1884). M. A. Gautier le premier a obtenu par voie chimique des différences dans l'analyse de deux chlorophylles extraites de deux espèces différentes. Tous les auteurs ont cependant continué à écrire sur la « chlorophylle » unique.

L'argument le plus sûr, utilisé pour conclure à une chlorophylle unique, consiste à dire que toutes les feuilles *vivantes* observées ont le même spectre (Tschirch). Cela est exact.

Mais deux chlorophylles identiques par leurs propriétés et leur analyse n'ont jamais été préparées dans deux laboratoires différents, agissant par leurs méthodes particulières.

	A. Gautier *Cristaux.*	Rogalsky	Hoppe Seyler *Chlorophyllane.*	Morot	Pfaundler
C	73.97	73.20-73.83	73.4	69.23	60.84
H	9.80	10.50-10.25	9.7	6.40	6.38
Az	4.15	4.14-4.14	5.6	8.97	0.03
O	10.33		9.57	15.38	32.78

Il est vraisemblable que la chlorophyllane de Hoppe-Seyler (qui n'est pas regardée comme une espèce) était une chlorophylle moins pure que celles de M. A. Gautier, car je ne pense pas qu'il y ait des chlorophylles aussi riches en azote.

La feuille vivante a toujours le même spectre. De plus j'ai observé que la solution alcoolique verte *recemment* faite, contenant non séparés tous les éléments solubles du grain vivant, avait comme ce dernier un spectre toujours le même. Mais souvent cela ne dure que peu de temps, et dans la solution neutre on voit des variations se produire. La mâche ordinaire (*valerianella olitoria*) montre très nettement cette action du temps amenant une sorte de mort moléculaire et l'apparition spontanée dans le violet d'une forte bande noire qui n'existait pas une heure avant. Dans ces conditions personne ne peut avoir la matière verte des feuilles *in actu*. Seules les diverses chloro-

phylles mortes qu'on peut séparer de la plante coupée ont été extraites en bloc par les chimistes. Presque tous ont poursuivi le but d'isoler « la chlorophylle », et par suite n'ont pas tenté de fractionner les différentes matières vertes possibles. D'ailleurs les masses d'extrait étaient trop faibles. Il faut au moins dix kilogrammes de feuilles sèches, soit cent kilos de plante fraîche, pour entreprendre un travail utile.

Les chlorophylles mortes sont loin de perdre toute importance. N'est-ce pas par l'étude du cadavre qu'on arrive à connaître l'anatomie du vivant? Si par les dissolvants, aussi neutres que possible, on isole diverses chlorophylles bien caractérisées, on est en droit de conclure que le corpuscule vivant les contenait. Liées peut-être entre elles et tenues en équilibre dans le but d'absorber la lumière selon un certain spectre discontinu, elles n'en étaient pas moins des pièces distinctes que le faible effort chimique de la mort et du temps ont séparées. Dans cet ensemble, chacune des chlorophylles travaille au temps de la vie avec ses fonctions propres, se formant et se dédoublant continuellement. Malgré le spectre unique d'un organe vivant, il peut donc exister une infinité de chlorophylles. Le spectre des feuilles est caractérisée par une forte bande $\lambda = 687 - 650$; une seconde $\lambda = 628 - 606$; une troisième $\lambda = 589 - 568$; une quatrième $\lambda = 548 - 537$. On commence à apercevoir la lumière dans le rouge $\lambda = 730$, et le spectre se termine dans le violet vers $\lambda = 525$. Les trois premières bandes sont d'intensité décroissant rapidement : elles donnent l'impression d'objets à contours indécis vus en perspective et dont la netteté s'efface de plus en plus avec l'éloignement. La quatrième est un peu plus intense que la troisième. Ces bandes se retrouvent, surtout la première et la seconde qui sont les plus fortes, dans tous les spectres chlorophylliens et leur donnent une assez grande similitude.

Quelle peut être la raison de la diversité des molécules vertes contenues dans les végétaux. Comme nous l'avons déjà vu il s'agit pour la plante de faire les synthèses prescrites pour son hérédité. Chaque molécule chlorophyllienne partielle a son mode de selection des radiations. Les bandes, sortes de tourbillons optochimiques, mettent en contact l'énergie avec la matière. Par ces bandes et les propriétés découlant de leur structure chimique, les chlorophylles construisent des molécules

spéciales, les abandonnent par une sorte de desquamation, les versent dans le milieu cellulaire et, comme dans tout acte de vie, recommencent leur cycle.

Une chlorophylle unique ne semble pas pouvoir faire à la fois des huiles et des sucres. Prises en masse, les chlorophylles sont de nature grasse et insoluble à première vue, et ainsi la fixation du carbone sous l'influence de la lumière semble bien se faire, pour une très large part, non dans l'eau, mais dans un milieu gras. L'expérience m'a montré que les chlorophylles diverses sont très réductrices : leur émulsion potassique réduit avec formation de miroir le nitrate d'argent ammoniacal. Leur composition prouve un grand déficit d'hydrogène et par suite des *lacunes*, capables de fixer les principes de l'air.

Il est un fait dont on n'a pu encore tenir compte dans les hypothèses relatives à la synthèse végétale, et qui y joue assurément un grand rôle, c'est la présence du carottène, répandu à profusion dans le monde végétal, comme l'a montré M. Arnaud. La croissance des plantes est liée selon cet auteur à la quantité de carottène. Ce carottène, très désaturé, possède la propriété curieuse pour un hydrocarbure d'être très coloré, et de donner des bandes d'absorption. C'est là une véritable chlorophylle jaune, et c'est ce corps qu'on a appelé xanthophylle.

Je n'ai pas la pensée d'expliquer par ces considérations des faits dont la technique réserve à la chimie biologique un travail sans fin. En fait, cherchons un exemple rapide de diversité chlorophyllienne dans le cas des fougères communes du commerce (Aspidium filix fœmina).

Cette plante, par une méthode de séparation que j'ai décrite (*Compt. Rend.*, t. CXIV, p. 1116, 1892) donne successivement :

1° Un alcool blanc $C^{16}H^{32}O$;

2° Du carottène ;

3° Aspidiophylle 1 — $C^{208}H^{347}O^{32}Az$. Première chlorophylle à bandes se rapprochant de la composition des acides gras ;

4° Aspidiophylle 2 — $C^{240}H^{320}O^{31}Az^{5}$. Belle matière colorante cireuse à reflets bleus colorant les dissolvants au 1/1000000e.

5° Aspidiophylle 3 — $C^{21}H^{346}O^{48}Az^{20}$.

Je mentionne non les formules rationnelles, mais les formules brutes qui permettent un commentaire.

La chlorophylle I a une composition se rapprochant de celle des acides gras incomplets. L'oxygène et le carbone s'y trouvent dans le rapport de 2 à 13, l'azote étant peu abondant.

L'élément hydrocarbure domine dans la formule. Aussi cette chlorophylle, insoluble dans l'eau, se dissout dans le sulfure de carbone et le pentane en toutes proportions. Pyrogénée, elle donne en abondance une huile non saturée formant un savon. Le sulfure de carbone n'enlève que cette chlorophylle aux feuilles sèches.

La chlorophylle II n'est pas enlevée aux feuilles par le sulfure de carbone qui les laisse colorées ; il faut employer l'alcool. Cette matière est déjà moins une graisse, l'élément hydrocarbure y est moins influent. L'oxygène et le carbone sont ici dans le rapport de 2 à 15, mais l'azote intervient dans une proportion 5 fois plus grande. La pyrogénation *ne rend plus, à beaucoup près,* autant d'acides gras ; une partie de l'oxygène est liée au carbone comme dans les sucres. Cette chlorophylle tend déjà vers les sucres et vers les albumines, vers les états solubles dans l'eau par lesquels les fragments chlorophylliens se déversent dans le protoplasma ou peuvent être digérés par lui.

La chlorophylle III ne possède plus de notable partie hydrocarbure. L'oxygène et le carbone sont comme 2 : 9, sans compter une forte proportion d'azote. Elle n'est pas encore soluble dans l'eau mais s'émulsionne avec les liquides un peu alcalins. L'azote dans ces formules a varié comme suit : 1, 5, 20. On voit donc qu'il y a des chlorophylles diverses, et de diverses fonctions dans une même plante.

Erratum. — Dans l'article de M. Bordet, p. 277, lire : « agglutine trois ou quatre parties de sang de *poule* », au lieu de « trois ou quatre parties de sang de *pigeon* ».

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

13me ANNÉE JUIN 1899 N° 6

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE SUR L'IMMUNITÉ VIS-A-VIS DES COMPOSÉS ARSÉNICAUX

TROISIÈME MÉMOIRE

DU ROLE DES LEUCOCYTES DANS L'IMMUNISATION CONTRE L'ACIDE ARSÉNIEUX SOLUBLE

Par le Dr BESREDKA

(Travail du laboratoire de M. E. Metchnikoff.)

L'histoire des arsénicophages de Styrie, parvenant à s'entraîner de façon à ingérer des doses formidables d'arsenic, fit naître l'espoir chez les bactériologistes que l'arsenic serait la substance de choix pour l'étude de l'accoutumance et d'autres problèmes se rattachant à l'immunité.

On s'est bientôt aperçu que cet espoir ne devait pas se réaliser, les animaux de laboratoire s'étant montrés complètement réfractaires à toute tentative de vaccination, si mesurée qu'on la fasse.

Dernièrement M. Brouardel[1] a repris cette question dans une monographie très documentée sur l'arsénicisme. Mettant à profit des nouvelles méthodes d'immunisation contre les toxines, ce savant a expérimenté sur un grand nombre d'animaux, lapins et cobayes, mais sans résultat appréciable. Il lui a semblé que dans quelques cas les cobayes auxquels il faisait ingérer de l'acide arsénieux présentaient une légère accoutumance et finissaient par supporter la dose mortelle; mais, dans tous les autres cas, les animaux traités devenaient plus sensibles et succombaient parfois à des doses inférieures à la dose mortelle.

1. Thèse de Paris, 1897.

Nous avons essayé, à notre tour, différentes méthodes d'immunisation en nous inspirant surtout des connaissances acquises au sujet des toxines.

Malgré le nombre considérable d'animaux soumis aux procédés d'immunisation les plus variés, les résultats obtenus ont été en général peu encourageants. Toutefois, au cours de nos expériences, nous avons eu plusieurs lapins qui ont supporté la dose sûrement mortelle.

Nous sommes parvenus à ce résultat, soit en administrant à des lapins des doses considérables, mais non mortelles, séparées par de longs intervalles, soit en commençant l'immunisation par des doses très faibles (1 milligramme), en les augmentant d'une façon très lente, et en ne pratiquant une nouvelle injection que lorsque l'animal avait repris son poids primitif.

D'une façon ou de l'autre, il fallait des mois entiers pour avoir un lapin sur trois survivant à la dose mortelle minima. C'est certainement un résultat acquis au prix de beaucoup trop de difficultés pour que l'on puisse s'en montrer satisfait.

Ces expériences ont cependant prouvé que le lapin est susceptible de subir l'immunisation, qui reste pénible et faible, en même temps nous avons acquis la conviction que les procédés qui se montrent si efficaces pour les toxines sont sans utilité appréciable dès qu'il s'agit de l'arsenic. Il faut donc abandonner les procédés ordinaires de la vaccination, si on veut obtenir un résultat positif.

I

IMMUNISATION ACTIVE

Si le lecteur veut bien se reporter à notre précédent mémoire, il verra que l'animal neuf, soumis à une dose mortelle d'arsenic [1], réagit en hypoleucocytose qui, suivant la dose, est tantôt remplacée au début par une hyperleucocytose transitoire, tantôt représente la seule manifestation leucocytaire dès le début de la maladie jusqu'aux derniers moments de la vie.

Cette hypoleucocytose, avec les caractères que nous connais-

1. Il s'agit, au cours de tout ce travail, de l'acide arsénieux en solution alcaline comme dans le précédent mémoire.

sons déjà, fait complètement défaut quand la dose du poison n'est pas mortelle pour l'animal.

En présence de ces faits, nous nous sommes demandé si, en supprimant l'hypoleucocytose si funeste pour l'animal, on ne réussirait pas à lui faire supporter impunément une dose pourtant mortelle.

Il s'agissait, en d'autres termes, d'injecter une dose mortelle sans déterminer la chimiotaxie négative, qui, privant l'organisme de ses moyens naturels de défense, exposait ses cellules sensibles, notamment les cellules nerveuses, à l'action immédiate du poison.

L'expérience ainsi conçue se montra d'une exécution très facile. Au lieu d'injecter d'un seul coup, brutalement, la dose mortelle en totalité, divisons-la en quatre doses et injectons-en d'abord un quart. Après une hypoleucocytose de courte durée, vient une hyperleucocytose prononcée avec ses caractères habituels, sur lesquels nous n'insistons pas.

Injectons le deuxième quart ; au moment de cette deuxième injection nous sommes en pleine hyperleucocytose ; les leucocytes qui pullulent dans le sang viennent de subir le contact de l'arsenic, et lors de cette deuxième injection ne s'en montrent nullement ou très peu impressionnés. Au lieu de faire preuve d'une chimiotaxie négative et de fuir dans les organes, ce qu'ils auraient fait en présence d'une dose représentant la somme des deux premiers quarts injectés en une seule fois, ils éprouvent au contraire vis-à-vis de la nouvelle dose une chimiotaxie positive presque aussitôt après l'injection.

Le troisième et le quatrième quarts subissent le même sort, c'est-à-dire sont accueillis, par les leucocytes, par une chimiotaxie de plus en plus appréciable.

De cette façon, en espaçant les doses, on parvient à faire accepter à un lapin une dose d'arsenic qui, injectée en une fois, l'eût sûrement tué en 24 heures ou même plus rapidement ; et ceci parce qu'ayant accoutumé les leucocytes à l'arsenic par la première injection, ceux-ci ne fuient plus devant lui lors d'injections ultérieures : ils restent dans le sang au cours de l'immunisation en plus ou moins grand nombre, ou le quittent et reviennent le lendemain en masse, pour offrir à l'arsenic une résistance plus efficace en l'empêchant d'aller toucher aux éléments sensibles de l'organisme.

L'expérience montre en effet que le lendemain ou le surlendemain, ainsi que pendant les 4 ou 5 jours suivants, on observe une hyperleucocytose des plus fortes, avec accroissement inusité de la proportion des polynucléaires (jusqu'à 90 0/0 au lieu de 35 0/0).

Si l'expérience est bien conduite, l'animal n'est pas malade, ou bien se rétablit déjà au plus tard le lendemain de l'opération.

En ce qui concerne les moments des inoculations, nous les pratiquons quatre fois dans le courant de la journée : à 9 heures, à midi, à 3 heures et à 6 heures.

On ne peut pas évidemment supposer que si l'animal supporte facilement dans ces conditions la dose mortelle, ce ne soit qu'à la faveur d'une élimination plus rapide du poison : d'abord l'arsenic s'élimine très lentement et on en retrouve encore des traces 40 jours après l'injection ; puis, nous savons que l'arsenic s'élimine principalement par les reins ; or, chez un lapin traité comme nous venons de le décrire, la diurèse est réduite au minimum, et c'est à peine si l'on réussit à recueillir quelques c. c. d'urine les premiers jours qui suivent l'opération.

Voici donc un procédé qui permet d'injecter facilement et sûrement, dans l'espace d'un jour, une dose mortelle, sans qu'il soit nécessaire de recourir à une immunisation aléatoire qui, non seulement, demande des mois de surveillance, mais encore souvent ne se termine pas au gré de l'expérimentateur.

***

Un autre procédé, basé sur le même principe, permet d'introduire une dose d'arsenic supérieure à la dose mortelle [1] ; il suffit que le poison soit injecté en 2 fois, séparées par un intervalle de 15 à 24 heures.

Supposons que, pour tuer en 48 heures un lapin d'un poids déterminé, il faille 10 c. c. de la solution arsénicale.

Injectons-en sous la peau, le soir, 2 c. c., et le lendemain matin ou 24 heures après, injectons en une seule fois, toujours sous la peau, 10 c. c. de la même solution, c'est-à-dire la dose sûrement mortelle. Notre lapin n'en mourra cependant pas.

Ceci semble paradoxal : voici un animal qui, outre la dose

1. Nous désignons ainsi la dose d'acide arsénieux qui tue en 48 heures.

mortelle, reçoit la veille une dose supplémentaire du poison, qui, certes, n'a pas encore eu le temps d'être éliminé; l'animal est donc en possession d'une quantité d'arsenic (12 c. c.) qui tuerait un lapin du même poids non plus en 48 heures, mais en 24 heures ou même plus rapidement; et cependant, il résiste.

Il est clair que si l'animal survit dans ces conditions, c'est précisément grâce à la petite dose (2 c. c.) reçue la veille, celle-ci ayant accoutumé l'animal à l'arsenic et l'ayant préparé à supporter le lendemain une dose sûrement mortelle.

Cette petite dose de la matière toxique joue donc le rôle de la substance préventive préservant l'animal de l'intoxication mortelle. Si nous ajoutons que la cause intime de cette action préventive réside dans la vaccination des leucocytes, nous pourrons en déduire des indications précieuses sur la nature chimique et sur le mode d'action des substances préventives en général.

A l'appui du rôle vaccinant de la petite dose d'arsenic vis-à-vis des leucocytes, nous pouvons apporter l'expérience suivante inspirée par le mémoire de MM. Roux et Borrel.

S'il est vrai que les leucocytes subissent une certaine accoutumance par le fait qu'ils ont été mis en contact la veille avec une petite quantité de poison, s'il est vrai que c'est à la faveur de cette accoutumance que l'animal supporte le lendemain la dose mortelle, les choses doivent se passer autrement si, le lendemain, on pratique l'injection non sous la peau, mais par une autre voie permettant d'éliminer l'intervention des leucocytes.

Les injections intra-cérébrales se trouvent tout indiquées pour cette expérience. Nous en avons déjà parlé dans le précédent mémoire, nous n'y insistons pas. Disons seulement que pour les injections intra-cérébrales la dose minima mortelle, c'est-à-dire, celle qui tue le lapin en 48 heures, représente 1/100 de la dose minima mortelle en injection sous-cutanée.

Cette dose établie, injectons à un lapin une petite quantité d'acide arsénieux (2 c. c.) sous la peau, puis le lendemain une dose mortelle en 48 heures (1/100 de la dose sous-cutanée), mais cette fois, non plus sous la peau, mais directement dans la masse cérébrale.

Les conditions de l'expérience sont donc les mêmes que

précédemment, avec cette différence que cette fois-ci nous avons exclu l'intervention des globules blancs.

Si le rôle des leucocytes est nul, nous devons obtenir dans ce cas aussi une survie. L'expérience montre cependant qu'il n'en est rien : non seulement, il n'y a pas de survie, mais tout au contraire le lapin meurt dans ces conditions plus rapidement (en 24 heures) que le témoin qui reçoit l'injection intracérébrale seule, et dont la mort ne survient qu'en 48 heures.

Il est à peine besoin d'en indiquer la raison : l'injection sous-cutanée et l'injection intra-cérébrale agissent en additionnant leurs effets, tandis que lors de la première expérience, au contraire, l'effet de la dose mortelle du lendemain se trouve amorti, pour ainsi dire, par la petite dose d'arsenic de la veille, — et ceci par le mécanisme que nous avons déjà indiqué.

*
* *

Sont-ce uniquement les phagocytes du sang circulant qui subissent la vaccination dans ce cas, ou bien y a-t-il d'autres éléments phagocytaires qui y prennent part également ? Nous ne pouvons répondre catégoriquement à cette question ; d'un côté, nous ne possédons pas de réaction microchimique pour déceler le poison, et, d'un autre côté, nous ne pouvons pas isoler des phagocytes fixes comme cela a été fait pour les phagocytes mobiles, les leucocytes. Pourtant certains faits nous font croire que les éléments phagocytaires du foie, par exemple, ne sont pas étrangers à l'accoutumance que subit si évidemment le système leucocytaire.

Ainsi, quand on fait supporter à un lapin une dose mortelle d'arsenic dans les conditions indiquées, et qu'on examine en même temps que les globules blancs tous les viscères, on constate que, de tous les organes, c'est le foie qui contient proportionnellement la plus grande quantité de poison.

C'est ce qui ressort de l'expérience suivante : après avoir injecté une dose mortelle (par le procédé indiqué plus haut), faisons reposer l'animal pendant un certain temps (8 à 15 jours), puis reprenons l'expérience : si huit jours après l'injection de la deuxième dose mortelle on sacrifie l'animal, on est étonné de la quantité d'arsenic que contient le foie en comparaison avec d'autres organes.

Il y a donc probablement dans le foie des cellules qui subissent aussi l'accoutumance, laquelle se traduit par la propriété qu'elles acquièrent d'emmagasiner des quantités de plus en plus considérables du poison.

*
* *

Ainsi nous avons à notre disposition deux procédés d'immunisation active. Dans l'un comme dans l'autre, les phénomènes leucocytaires se traduisent par une hyperleucocytose polynucléaire, comme il a été déjà indiqué dans le précédent mémoire. Remarquons que dans le second procédé (petite dose la veille, puis dose mortelle le lendemain), vu la dose considérable de l'arsenic, le stade initial de l'hypoleucocytose ainsi que celui de l'hyperleucocytose sont beaucoup plus accentués, à la fois au point de vue de la durée et de l'intensité des réactions leucocytaires.

*
* *

On pourra nous dire que nos procédés d'immunisation sont encore très imparfaits, puisqu'ils ne permettent d'employer que des doses simplement mortelles ou des doses les dépassant très peu, tandis que par les procédés bactériologiques on peut immuniser contre des doses 100, 1.000 fois mortelles et plus.

A ceci nous pouvons répondre que cette comparaison n'est guère possible, car il s'agit là de substances toxiques d'ordre un peu différent et par conséquent non comparables.

Expliquons-nous. Nous avons appelé dose minima mortelle celle qui tue en 48 heures : si nous l'augmentons d'un cinquième seulement, c'est-à-dire, si au lieu d'injecter une unité [1] du poison, nous en injectons 6/5, l'animal meurt en 24 heures ou même plus rapidement. Il suffit d'augmenter un peu la dose et d'injecter par exemple 7/5 ou 8/5 de la dose initiale, pour que le lapin meure déjà au bout de 12-10 heures. Si nous doublons la dose, la mort surviendra en 2-3 heures.

Il ressort donc que les termes, — dose une fois, deux fois mortelle, — n'ont pas la même signification à l'égard de l'acide arsénieux ou de la toxine diphtérique, par exemple, dont on

1. On peut naturellement tuer un lapin en plus de 48 heures, en quelques jours ; mais ces doses étant difficiles à régler d'avance, nous avons pris pour l'unité celle qui tue en 48 heures, dose facile à déterminer avec beaucoup d'exactitude.

peut injecter une dose 2 fois, 10 fois et 100 fois mortelle sans que la mort soit pour cela sensiblement accélérée : avec la dose 100 fois mortelle de toxine diphtérique ou tétanique, on ne peut pas tuer un lapin en moins de 24 heures.

On ne peut donc pas appliquer à l'acide arsénieux le langage courant pour les toxines microbiennes, car la dose d'arsenic deux fois mortelle est déjà une dose presque foudroyante.

Voilà pourquoi nous aimons mieux employer les termes : dose mortelle en 48 heures, en 24 heures, etc., parce qu'ils traduisent le véritable effet toxique ; voilà aussi pourquoi on ne doit pas s'étonner que nos procédés d'immunisation active semblent conférer à des animaux une immunité relativement faible.

II

IMMUNISATION PASSIVE

Les deux procédés d'immunisation que nous avons exposés plus haut peuvent être combinés en un seul; on confère de la sorte à l'animal une immunité plus assurée vis-à-vis de la dose mortelle en 48 heures.

Dans la pratique, nous procédons de la façon suivante : si nous désirons injecter à un lapin en tout 15 c. c. de la solution arsénicale (cette dose étant supérieure à la dose minima mortelle), nous lui injectons la veille au soir 3 c. c., puis le lendemain le reste en 4 fois à des intervalles réguliers, comme il a été indiqué plus haut.

Si, 6 ou 8 jours après cette opération, on examine le sérum d'un lapin ainsi préparé, on constate que ce sérum a acquis des propriétés nouvelles.

Tandis que le sérum des lapins neufs n'influe aucunement sur la marche de l'intoxication arsénicale produite chez un autre lapin, que ce sérum soit injecté la veille ou en même temps que le poison, et quelle que soit la quantité injectée, le sérum des lapins immunisés révèle à la fois des propriétés antitoxiques et préventives vis-à-vis de l'acide arsénieux en solution.

De nombreuses expériences ont montré qu'avec 8 c. c. du

sérum des lapins immunisés on peut préserver un lapin neuf contre la dose sûrement mortelle en 48 heures, et ceci que l'acide arsénieux soit injecté en même temps que le sérum, ou qu'il ne soit injecté que 24 heures après le sérum.

Dans ce dernier cas une dose de sérum même moindre — 5 à 6 c. c. — suffit pour obtenir un effet préventif.

Afin de mettre en évidence la propriété antitoxique du sérum, on peut à volonté, ou mélanger le sérum et le poison *in vitro*, et injecter le tout en un point, ou bien injecter séparément le sérum et la solution arsénicale en différents côtés du corps du lapin.

Cette propriété du sérum, apparaissant parfois après une première injection, devient surtout manifeste lorsque le lapin a reçu deux fois la dose mortelle dans les conditions indiquées, à 8-10 jours d'intervalle.

Il est de toute nécessité de s'adresser à des lapins vigoureux, bien nourris, car souvent après la première épreuve ils maigrissent et se prêtent mal à une seconde immunisation : il en résulte un sérum peu efficace qui ne confère qu'une survie passagère, durant de 3 à 15 jours [1].

Il est utile aussi d'être prévenu contre la sensibilité spéciale que présentent certains lapins vis-à-vis de l'arsenic ; ainsi on rencontre, surtout en hiver, des lapins qui succombent à une dose d'arsenic inférieure à la dose minima mortelle ; on constate souvent dans ce cas la coccidiose du foie.

Il est à remarquer que ces lapins sensibles se montrent généralement réfractaires à l'action du sérum antiarsénieux, et qu'eux-mêmes, immunisés par des doses fractionnées, fournissent un sérum peu actif ou bien dénué de toute propriété spécifique. Cette sensibilité particulière serait peut-être due à la facilité avec laquelle les animaux arsénisés contractent des infections secondaires. Comme M. Wurtz, nous avons constaté aussi très souvent la présence des microbes dans le sang des animaux morts par l'arsenic. Cette infection secondaire n'étant pas toujours nécessairement mortelle, on comprend jusqu'à un certain point ce fait étrange au premier abord, que parmi les lapins soumis à l'immunisation on en trouve dont le sérum reste inactif.

1. Nous avons remarqué qu'en été les lapins supportent beaucoup mieux l'arsenic qu'en hiver, et qu'en même temps le sérum qu'ils fournissent en été est beaucoup plus actif qu'en hiver ; nous pensons que la nourriture n'y est pas étrangère, sans parler de l'influence de la température.

*
* *

En présence d'un sérum antitoxique préparé avec une toxine aussi connue que l'acide arsénieux, la première question qui se pose c'est de savoir si ce sérum contient de l'arsenic ou n'en contient pas ; en d'autres termes si, dans notre cas, l'antitoxine est fabriquée aux dépens de la toxine ou en est tout à fait indépendante.

A la suite de nombreuses analyses de sérums pratiquées par le procédé de M. Ogier [1], nous sommes porté à croire que l'antiarsénine est une substance non arsénicale.

Cette conclusion semble d'abord en contradiction avec les faits fournis par l'analyse ; en effet, dans la grande majorité des échantillons des sérums, nous constations la présence de l'arsenic, et à tel point que nous avons été d'abord fort tenté d'établir une relation de cause à effet entre la présence de l'arsenic dans le sérum et son pouvoir antitoxique ; d'autant plus que chez les lapins ayant reçu une dose considérable, mais non mortelle, par le procédé ordinaire, c'est-à-dire, en une seule fois, on ne trouve point d'arsenic dans le sérum, et celui-ci, comme on le sait, ne possède aucune propriété spécifique.

Mais réflexion faite, cette relation entre la présence de l'arsenic dans le sérum et le pouvoir antitoxique de celui-ci ne nous semble pas être réelle, et voici pourquoi.

Nous avons dit plus haut que 8 c. c. de sérum antiarsénieux suffisent généralement pour préserver l'animal contre la dose mortelle, qui représente 10 milligr. environ d'arsenic métallique. La quantité de sérum que nous soumettions à l'analyse variait entre 25 et 30 c. c., et représentait par conséquent une dose trois fois supérieure à celle qui suffit pour manifester un effet antitoxique. Et cependant la quantité d'arsenic contenue dans ces 25 à 30 c. c. de sérum se traduisait par un anneau non dosable d'arsenic. D'où il faut conclure que l'antitoxine est formée aux dépens d'une quantité infinitésimale de toxine, surtout si on tient compte de la masse de cette dernière nécessaire pour faire naître l'antitoxine. Cette disproportion énorme entre la richesse en arsenic de la toxine et de l'antitoxine nous semble plaider contre la nature antitoxique de l'arsenic contenu dans le sérum.

1. Voir notre deuxième mémoire, ces *Annales*, mars 1899.

Cette hypothèse peut être corroborée par ce fait, fourni par l'analyse, que l'épaisseur de l'anneau obtenu dans différents cas n'était pas en raison directe de l'efficacité du sérum.

Enfin, et c'est là l'argument qui a pour nous le plus de valeur, c'est que dans deux échantillons de sérum sûrement antitoxique nous n'avons pas trouvé la moindre trace d'arsenic.

En nous appuyant sur tous ces faits, nous pensons que le sérum peut être antitoxique sans pour cela contenir nécessairement de l'arsenic; en d'autres termes, que l'antiarsénine n'est pas formée aux dépens de la toxine.

* * *

Qu'est donc l'arsenic que l'on trouve presque constamment dans le sérum spécifique, et que l'on peut y déceler même plus de trois semaines après l'injection [1]?

Il est à peine nécessaire d'ajouter que l'on n'en a jamais trouvé dans le sérum d'animaux ayant reçu une, ou même plusieurs injections d'arsenic faites en une fois.

D'après nous, cet arsenic apparaissant dans le sérum spécifique, dans des conditions d'immunisation particulières, provient des globules blancs dont le contenu passe dans le sérum après la formation du caillot.

Déjà, par nos recherches antérieures, nous savons que, lors de l'immunisation par des doses fractionnées, les leucocytes absorbent une certaine quantité d'arsenic dont la présence peut facilement être constatée 5 à 6 jours après l'injection; c'est aussi à cette époque que nous recueillons le sérum; il est donc fort probable que l'arsenic que nous constatons dans le sérum soit le même que nous avons constaté précédemment dans la couche leucocytaire.

Cet arsenic du sérum présente une particularité intéressante sur laquelle nous désirons insister, et qui plaide aussi en faveur de sa provenance leucocytaire.

Graham, dans ses recherches sur la dialyse, a montré que l'acide arsénieux mélangé à différents organes et en particulier au sang peut en être séparé par le dialyseur; l'acide arsénieux, même au bout d'un séjour prolongé dans la masse sanguine,

1. Dans un cas nous avons trouvé un anneau très net d'arsenic dans 22 c. c. du sérum recueilli 25 jours après l'injection; ce sérum avait un pouvoir antitoxique faible.

ne contracte donc pas avec celle-ci de combinaisons telles qu'il cesse d'être dialysable à travers le parchemin.

Nous avons répété cette expérience avec du sérum sanguin, additionné d'acide arsénieux et soumis à la dialyse : nous avons retrouvé 24 heures après presque toute la quantité d'arsenic dans le vase extérieur du dialyseur.

Tel n'est pas le cas de l'arsenic que nous trouvons dans le sérum spécifique; on a beau le soumettre à la dialyse pendant 24 ou 48 heures, il ne franchit point la membrane animale.

Il faut donc conclure que cet arsenic dans le sérum y arrive déjà sous forme d'une combinaison non dialysable, et la constatation de l'arsenic dans la couche leucocytaire nous fait admettre que c'est pendant son séjour dans l'intérieur des leucocytes que l'arsenic entre dans cette combinaison.

*
* *

L'existence d'un sérum antiarsénieux ne présente évidemment d'intérêt qu'en tant que celui-ci permet de pénétrer plus profondément dans la compréhension de l'immunité. Tout en laissant de côté pour le moment les nombreuses questions que soulève ce sérum au point de vue de sa composition et de sa provenance, questions qui feront l'objet de nos études ultérieures, nous désirons tirer seulement quelques conclusions du fait seul de son existence.

On a beaucoup discuté sur la question de savoir comment agissent les antitoxines. Est-ce en neutralisant simplement les toxines, ou bien est-ce en renforçant les ressources naturelles de l'organisme, que les antitoxines rendent celui-ci plus apte à lutter contre les toxines?

Les deux hypothèses ont été soutenues sans que l'on pût apporter à l'appui des preuves entraînant la conviction, et cela parce que la nature des toxines aussi bien que celle des antitoxines est aussi mystérieuse que l'est leur mode d'action.

Avec l'anti-arsénine, il nous est permis, croyons-nous, de faire un pas en avant. Si nous appliquons à l'anti arsénine les deux hypothèses qui viennent d'être formulées, il est clair que la seconde paraîtra comme la plus probable.

Déjà ce fait qu'en mélangeant *in vitro* la solution d'acide

arsénieux avec le sérum antitoxique, nous ne constatons aucun phénomène ni chimique ni physique, ne nous permet pas d'admettre qu'il s'est produit là une combinaison arsénicale nouvelle dans le sens de la première hypothèse.

De plus, une considération d'un autre genre rend cette hypothèse encore moins probable. Si l'action de l'anti arsénine contenue dans 8 c. c. du sérum se bornait à une neutralisation pure et simple de l'acide arsénieux, c'est-à-dire. si l'antiarsénine agissait en formant avec l'acide arsénieux une combinaison non toxique, il faudrait en conclure qu'en doublant la quantité du sérum, on pourrait préserver l'animal contre une dose deux fois mortelle d'acide arsénieux ; or, la mort rapide de l'animal soumis à cette dose et même à une dose inférieure fournit un démenti à cette hypothèse.

Dans le même ordre d'idées. l'animal fournisseur de l'antitoxine devrait supporter des doses plusieurs fois mortelles d'arsenic, si en réalité il s'agissait seulement de la neutralisation de ce dernier par l'anti arsénine ; et cependant l'expérience montre qu'un lapin dont le sérum est antitoxique (8 c. c. contre une dose mortelle) supporte à peine une dose simplement mortelle (et ceci, pensons-nous, à la faveur de son immunisation active), bien qu'il charrie dans ses vaisseaux une quantité d'antiarsénine capable de conférer une immunité passive contre une dose minime, mais sûrement mortelle, à toute une série de lapins.

Mais peut-être, pourra-t-on objecter, l'anti arsénine exerce-t-elle son effet sans produire une neutralisation complète de la dose mortelle d'arsenic : en la supposant capable de neutraliser seulement une partie de la dose mortelle, on obtiendrait la survie, l'acide arsénieux libre étant réduit à la dose non dangereuse pour la vie de l'animal. Cette hypothèse aurait ceci de séduisant qu'elle expliquerait pourquoi, en doublant la dose de sérum, on ne peut pas préserver l'animal contre une dose deux fois mortelle ; en effet, dans l'hypothèse que l'antiarsénine sature un cinquième, par exemple, de la dose mortelle, on comprendrait bien la survie en cas d'une dose simplement mortelle, qui par ce fait serait réduite à la dose (4/5 de la dose mortelle) facilement supportable par l'animal. Mais lorsqu'on double la quantité du sérum. celui-ci ne peut neutraliser, en cas de la dose deux fois

mortelle, que 2/5 de la dose minima mortelle; il en reste 8/5 qui naturellement doivent tuer le lapin très rapidement.

Mais si cette interprétation était vraie, un lapin activement immunisé, vu la quantité du sérum qu'il possède, aurait dû supporter au moins une dose un peu supérieure à la mortelle, ce qui en réalité n'a pas lieu.

De tout ceci ressort l'impossibilité d'admettre l'hypothèse de la neutralisation de l'arsenic par l'antiarsénine; par contre, les faits cités trouvent leur justification dans la supposition que l'anti-corps en question agit sur l'organisme animal en l'excitant à se défendre plus activement contre la toxine. Ajoutons toutefois qu'il n'est pas dans notre pensée d'identifier *a priori* l'anti arsénine avec d'autres antitoxines connues, et d'étendre à ces dernières, en ce qui concerne leur action sur les toxines, les considérations qui viennent d'être exposées.

*
* *

Nous pouvons pousser plus loin l'analyse et nous demander maintenant quels sont les moyens de défense que l'organisme met en jeu dans ce cas. Lorsqu'on étudie les phénomènes leucocytaires chez l'animal passivement immunisé, on se rend facilement compte que les leucocytes y jouent un rôle très actif: déjà, dès le lendemain de l'opération, s'établit une hyperleucocytose de plus en plus accentuée; sans entrer dans les détails, disons qu'au point de vue leucocytaire, chez les animaux passivement immunisés, on observe exactement les mêmes phénomènes que nous avons signalés au cours de l'immunisation active.

On peut faire ressortir le rôle des leucocytes dans l'immunité passive par l'expérience suivante, analogue à celle que nous avons déjà réalisée à propos de l'immunité active.

Injectons préventivement à deux lapins, sous la peau, des quantités suffisantes de sérum antiarsénieux [1], et le lendemain injectons à chacun d'eux une dose d'acide arsénieux tuant en 48 heures seulement, de sorte qu'un de ces lapins la reçoive sous la peau, l'autre une dose correspondante (1/100 de la dose sous-cutanée) dans le cerveau. Deux témoins reçoivent les mêmes quantités d'arsenic — un sous la peau, l'autre dans le cerveau.

1. Nous injectons le sérum préventivement pour que son effet soit plus sûr.

De tous ces lapins il n'y a qu'un qui survit; c'est celui des deux immunisés qui a reçu de l'acide arsénieux sous la peau; l'autre lapin, immunisé aussi, mais inoculé dans la substance cérébrale, ainsi que les deux témoins, meurent 50 à 60 heures après l'opération.

L'interprétation de cette expérience est bien simple si on tient compte du rôle des leucocytes dans l'immunisation passive. En effet, en inoculant le lapin dans le cerveau, nous éliminons l'intervention du système leucocytaire, et comme notre sérum préventif agit précisément sur ce système, nous privons par conséquent l'animal de tout le bénéfice qu'il pourrait retirer du sérum; il se trouve donc placé dans les mêmes conditions, bien qu'immunisé, que son témoin non immunisé.

Cette expérience vient par conséquent confirmer notre hypothèse que le sérum antiarsénieux agit surtout sur et par l'appareil leucocytaire.

*
* *

Concluons :

On peut immuniser les lapins contre la dose sûrement mortelle d'acide arsénieux soluble en y accoutumant les leucocytes.

On y parvient tantôt en fractionnant la dose mortelle dans le courant de la journée, ou bien en injectant préventivement une petite dose du poison, et 24 heures après une dose mortelle.

Ces deux procédés peuvent être combinés en un seul.

Le sérum des animaux immunisés, soit par le procédé combiné, soit par celui des doses fractionnées seul, possède des propriétés à la fois préventives et antitoxiques contre une dose d'acide arsénieux tuant en 48 heures.

L'antiarsénine est, selon toute probabilité, un composé non arsénical.

L'arsenic qui accompagne l'antiarsénine n'est pas dialysable et est de provenance cellulaire.

L'hypothèse de l'action neutralisante de l'antiarsénine, totale ou partielle, est en opposition avec les faits.

L'antiarsénine agit sur la toxine par l'intermédiaire du système leucocytaire; la suppression de ce dernier paralyse l'action de l'antiarsénine.

Contribution à la pathogénie de l'appendicite.

(*Étude de la virulence du coli-bacille dans l'appendicite expérimentale.*)

PAR CHARLES DE KLECKI

Professeur de pathologie générale et expérimentale à l'Université de Cracovie.

Malgré les nombreuses recherches sur l'appendicite et les fréquentes discussions sur cette affection dans les sociétés médicales de tous les pays, la pathologie de l'appendice cæcal renferme toujours beaucoup de questions qui ne sont pas encore résolues.

Il est bien établi que, dans l'appendicite non spécifique, il se produit une infection locale de l'appendice cæcal par les saprophytes intestinaux, et que dans la majorité des cas cette infection est mixte. Mais on ne sait pas encore quel rôle jouent dans cette poly-infection les différents microbes intestinaux, ni quels sont les agents principaux de l'infection appendiculaire.

Dans les produits pathologiques de l'appendicite, on rencontre le plus constamment, quelquefois en culture pure, le coli-bacille, (Adenot [1], Poncet et Jaboulay [2], Talamon [3], Tavel et Lanz [4], Kirmisson [5], Fowler [Erik Wilson [6]], Obrastzow [7], Hodenpyl [8]) ; pour la plupart des auteurs il joue dans la pathogénie de cette affection un rôle important. D'après MM. Monod [9], Dieulafoy [10], Kümmel [11], Achard et Broca [12], les agents habituels de l'appendicite non spécifique sont le coli-bacille et le streptocoque. Pour

1. ADENOT, *Soc. de biol.*, 1891.
2. PONCET et JABOULAY, *Revue de méd.*, 1892, n° 17.
3. TALAMON, Appendicite et pérityphlite, Paris, 1892.
4. TAVEL et LANZ, Uber die Aetiologie der Peritonitis, *Mittheil. aus kliniken u. med. Inst. d. Schweiz*, I, Basel, 1893.
5. KIRMISSON, *Soc. de Chirurgie*, séance du 16 septembre 1895.
6. FOWLER (Erik Wilson), *Uber Appendicitis*, Berlin, 1895.
7. OBRASTZOW, Typhlite catarrhale aiguë, *La Méd. moderne*, 1896, n° 30.
8. HODENPYL, cité par LEGUEU. De l'Appendicite, Paris, 1897.
9. MONOD, *Soc. de Chirurgie*, séance du 16 octobre 1895.
10. DIEULAFOY, *Bull. de l'Académie de méd.*, 1896, n° 10.
11. KUMMEL, *Uber Perityphlitis*, Leipzig, 1896.
12. ACHARD ET BROCA, *Soc. méd. des Hôpitaux*, séance du 26 mars 1897.

M. Macaigne [1], le streptocoque est l'agent principal de la lésion. M. Welch [2] a trouvé dans un cas d'appendicite dans l'épanchement péritonéal le streptocoque en culture pure. Parmi les autres microbes, qui contribuent à la poly-infection de l'appendice, on cite le staphylocoque doré, des diplocoques, le bacille pyogène fétide, le bacille pyocyanique, le *micrococcus flavus liquefaciens*, le *proteus vulgaris*, le *bacillus subtilis* et quelques autres espèces microbiennes non déterminées, qui présentent une certaine ressemblance avec le bacille de Löffler, le pneumocoque, le bacille du tétanos et celui de la morve.

Dans l'appendicite expérimentale du lapin, MM. Roger et Josué [3] ont constaté les mêmes espèces microbiennes qu'on trouve dans l'appendice normal ; dans une expérience, le pus appendiculaire ne renfermait que le coli-bacille en culture pure.

D'après les recherches récentes de MM. Veillon et Zuber [4], les agents principaux de l'appendicite non spécifique sont des microbes anaérobies, dont les auteurs citent le *bac. fragilis*, *bac. ramosus*, *bac. perfringens*, *bac. fusiformis*, *bac. furcosus* et le *staphylococcus parvulus*. MM. Veillon et Zuber ont constaté dans 22 cas d'appendicite la virulence de ces microbes pour le cobaye et le lapin, et surtout leur prédominance sur le coli-bacille et les autres aérobies, quelquefois même leur existence exclusive dans le pus appendiculaire.

On voit donc qu'il règne encore parmi les auteurs un désaccord prononcé sur un point capital de l'étiologie de l'appendicite non spécifique.

La pathogénie de cette affection n'est pas mieux connue que son étiologie.

L'appendicite non spécifique résultant d'une infection par les microbes habituels de l'appendice, on peut admettre que, pour que l'affection éclate, il faut que les microbes exaltent leur virulence, ou que la paroi appendiculaire soit rendue accessible à l'action des saprophytes. Dans les deux cas, l'infection serait donc un procès secondaire, dû à une altération antérieure du microbe ou de l'appendice même. Les microbes

1. Macaigne, cité par Monod.
2. Welch, cité par Talamon.
3. Roger et Josué, Recherches expérimentales sur l'appendicite, *Revue de méd.* 1896 et *Soc. méd. des Hôpitaux*, séance du 31 janvier 1896.
4. Veillon et Zuber, Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie, *Arch. de méd. expér. et d'anat. path.*, 1898, nº 4.

exaltent-ils leur virulence dans l'appendicite, quelles sont les conditions pathologiques qui entraînent cette altération? Une appendicite peut-elle éclater sans exaltation de la virulence des microbes. Voilà des questions de premier ordre qui s'imposent à l'étude de l'appendicite, des questions qui sont encore loin d'être résolues.

Généralement les auteurs ont attribué un rôle prédominant, quelquefois même exclusif, à une seule condition ou à un seul des agents pathologiques, qui sont ici aussi nombreux et aussi compliqués que dans la plupart des autres affections.

C'est ainsi qu'on a établi les différentes théories de l'appendicite. Je ne veux pas entrer dans les détails de ces théories, si bien exposées dans les monographies sur l'appendicite de date récente, comme celles de MM. Fowler, Legueu, Monod et Vanverts[1], et dans un court résumé de M. Schmidt[2], et je me bornerai à citer la théorie de la colique appendiculaire par corps étranger (ou calcul stercoral) de M. Talamon; la théorie de l'appendicite par stagnation du contenu appendiculaire (Reclus[3]), provoquée par une affection catarrhale chronique du gros intestin (Aufrecht[4], Iversen, Kümmel, Foges[5]), spécialement par une entérite muco-membraneuse (Reclus[6], Mathieu et Le Gendre[7]); la théorie de l'appendicite par catarrhe lithogène (Mathieu[8]); la théorie par altérations régressives de l'appendice cæcal (Poirier[9]), et la théorie mécanique (Roux[10], Porter[11], Poirier[12]). On a aussi décrit une appendicite non spécifique épidémique (Goluboff[13]) qu'on attribue à une cause générale.

Enfin, la théorie la plus récente de l'appendicite de cause

1. Monod et Vanverts, L'appendicite. *Encyclopédie scientifique des aide-mémoire*, Paris.

2. Schmidt, Neuere Anschauungen über die Aetiologie der Perityphl. *Centralbl. f. d. Grenzgebiete d. Méd. u. Chirurgie*, 1898, nº 11.

3. Reclus, *Soc. de Chirurgie*, séances des 9 et 23 décembre 1896.

4. Aufrecht, Zur Pathologie und Therapie d. Perityphlitis, *Therap. Monatshefte*, 1895 nº 5.

5. Foges, Uber Appendicitis. *Soc. méd. de Vienne*, séance du 6 mars 1896.

6. Reclus, cité par Schmidt.

7. Mathieu et Le Gendre, *Soc. méd. des Hôpitaux*, séance du 29 janvier 1897.

8. Mathieu, *Soc. méd. des Hôpit.*, séance du 28 février 1896.

9. Poirier, cité par Reclus.

10. Roux, cité par Legueu, *Revue méd. de la Suisse romande*, avril 1890.

11. Porter cité par Legueu, *Boston méd and. Surgery Journal*, 1891, nº 14.

12. Poirier, *Soc. de Chirurgie*, séance du 16 décembre 1896.

13. Goluboff, Appendicite, maladie infectieuse, *Medicina*, 1896, nº 12.

locale est la théorie « de la cavité close » de M. Dieulafoy. D'après M. Dieulafoy, l'appendicite est toujours le résultat de la transformation du canal appendiculaire en une cavité close. Cette transformation peut se faire par différents mécanismes : par oblitération du canal appendiculaire par un calcul stercoral, par tuméfaction de la muqueuse résultant d'une infection locale, quelquefois par rétrécissement fibreux, lent et progressif. Une fois le canal appendiculaire transformé en cavité close, n'importe par quel mécanisme, les microbes normaux de l'appendice, jusque-là inoffensifs, pullulent et exaltent leur virulence. Dans une théorie antérieure, M. Talamon attribuait aussi une certaine importance à la transformation de la cavité appendiculaire en un « vase clos » ; M. Dieulafoy en fit le point essentiel de sa théorie.

La théorie de l'appendicite par cavité close est fondée pour une part sur les recherches cliniques et anatomiques de M. Dieulafoy ; pour une autre, notamment en ce qui concerne la pullulation et l'exaltation de la virulence des microbes en cause, elle s'appuie sur les résultats d'une étude sur la pathogénie de la péritonite d'origine intestinale, que j'ai publiée dans ces *Annales* [1] en 1895. Dans cette étude, j'ai trouvé que les microbes renfermés dans une anse intestinale étranglée et non perforée pullulent. et que le coli-bacille, dont le rôle pathogène était l'objet spécial de mes recherches, exalte sa virulence encore à l'intérieur de l'anse étranglée, avant son passage à travers la paroi intestinale dans la cavité péritonéale. J'ai obtenu ce résultat dans 8 expériences, où l'étranglement d'une anse intestinale avait produit une stase veineuse et des altérations inflammatoires de la paroi. Pour étudier les variations de la virulence du coli-bacille dans ces conditions, j'avais appliqué la méthode comparative, qui seule d'après mon avis fournit des résultats exacts ; c'est pourquoi il a fallu immobiliser le contenu de l'anse étranglée, en autres termes transformer la cavité de cette anse en une cavité close. M. Dieulafoy, trouvant une analogie entre ces expériences et ce qui passe en conditions pathologiques dans l'appendice cæcal, appliqua leur résultat à la pathogénie de l'appendicite.

1. De Klecki, Recherches sur la pathogénie de la péritonite d'origine intestinale. Étude de la virulence du coli-bacille. *Annales de l'Institut Pasteur*, septembre 1895.

*
* *

L'exaltation de la virulence d'un microbe résulte de la somme d'influences biologiques exercées sur le microbe, et de ses réactions réciproques. Il est évident que dans la cavité intestinale ces agents, encore peu étudiés, sont très nombreux et très compliqués. J'ai essayé de montrer pour le coli-bacille une de ces influences, notamment celle qui dépend des conditions symbiotiques du microbe. Il est fort probable que d'autres saprophytes intestinaux peuvent aussi, de même que le coli-bacille, exalter leur virulence ; mais cette hypothèse, très justifiée, manque encore d'une démonstration expérimentale.

Si on envisage les altérations que subit la constitution chimique et morphologique du contenu d'une anse étranglée, on est conduit à la conclusion que le changement des propriétés vitales des microbes qu'elle renferme est en rapport avec les altérations de leur milieu extérieur.

Il est vrai que seule l'occlusion mécanique d'une anse intestinale peut entraîner quelques altérations de son contenu, notamment celles qui résultent de l'action irritante des masses stagnantes sur la paroi intestinale, et celles qui résultent de la résorption inégale de différents éléments du contenu intestinal Dans les stades avancés de la maladie, l'occlusion intestinale peut même contribuer, par accumulation du contenu de l'anse pathologique et par distension de sa paroi, aux altérations de la circulation sanguine dans cette anse, et à celles de son contenu qui en sont la conséquence. Mais dans une anse étranglée les altérations du contenu, provoquées par l'occlusion mécanique, passent au second plan vis-à-vis des altérations résultant de la lésion histologique de la paroi intestinale, dont les produits pathologiques se mélangent aux éléments du contenu de l'anse étranglée et changent sa constitution d'une façon très prononcée.

Dans mon étude antérieure, citée plus haut, l'étranglement d'une anse intestinale n'entraînait pas dans tous les cas une exaltation de la virulence du coli-bacille. Sur 10 expériences, où l'anse étranglée fut transformée en une cavité close, j'ai constaté une exaltation de la virulence du coli-bacille 8 fois ; c'étaient les expériences « caractérisées par la stase veineuse et en même temps par un état inflammatoire de la paroi de l'anse étranglée ».

Dans les 2 autres expériences « où on avait produit une anémie de la paroi de l'anse étranglée », la virulence du coli-bacille n'était pas exaltée ; dans une de ces expériences, elle était même un peu inférieure à celle du microbe retiré de la même anse à l'état normal.

Les altérations du contenu intestinal, résultant de la lésion de la paroi, sont trop compliquées pour qu'on puisse affirmer, en s'appuyant sur ces expériences, qu'une stase veineuse d'une anse intestinale entraîne toujours une exaltation de la virulence du coli-bacille renfermé dans son contenu, et que cette altération du microbe ne se produise jamais dans une anse anémique. Néanmoins, je pense qu'il ressort de ces expériences un certain rapport entre les propriétés vitales du coli-bacille et la lésion histologique de l'anse étranglée, notamment celle qui est due à l'altération de la circulation sanguine. Il me paraît parfaitement admissible que les altérations chimiques et morphologiques du milieu extérieur des microbes, provoquées par la lésion histologique, influencent la flore intestinale non seulement en favorisant le développement de quelques espèces microbiennes, et en supprimant d'autres, mais qu'elles influencent aussi directement les propriétés vitales, et par conséquent la virulence des microbes. La stagnation des masses fécales, transformées par les produits de la lésion histologique, contribue peut-être aussi par accumulation des sécrétions bactériennes à une altération des influences réciproques des microbes.

En poursuivant ces idées, j'ai cru pouvoir les appliquer à l'étude de la pathogénie de l'appendicite.

Dans les recherches présentes, j'ai étudié la virulence du coli-bacille dans l'appendicite expérimentale du lapin.

Les expériences ont été exécutées en 1897 ; je ne publiai pas leur résultat, attendant que les observations cliniques, si nombreuses et si détaillées dans ces derniers temps, éclairent de leur côté la pathogénie de l'appendicite.

A présent que les recherches de MM. Veillon et Zuber tendent à éliminer le rôle des aérobies de l'étiologie de cette affection, je présente mes observations sur la virulence du coli-bacille dans l'appendicite expérimentale.

En regardant le coli-bacille comme un des agents pathogènes de l'appendicite non spécifique, je me suis demandé si l'occlu-

sion de la cavité appendiculaire est une condition indispensable pour l'exaltation de la virulence de ce microbe ; j'ai tâché de me rendre compte, si cette altération du microbe ne dépend pas plutôt de la lésion histologique de la paroi appendiculaire. Pour l'étude expérimentale, la question se présentait donc de la façon suivante : est-il possible d'exalter la virulence du coli-bacille dans un appendice cæcal, dont la cavité reste ouverte, et dans quelles conditions est-ce possible? Est-il possible que le microbe n'exalte pas sa virulence, malgré une occlusion du canal appendiculaire? Enfin, l'importance de l'occlusion appendiculaire dans la pathogénie de l'appendicite étant confirmée par les expériences de MM. Roger et Josué, qui ont trouvé que le seul procédé expérimental pour provoquer chez le lapin une appendicite est la ligature complète de l'appendice, je me suis demandé si une appendicite suppurée ne peut éclater chez cet animal sans occlusion de la cavité appendiculaire.

En partant des idées exposées plus haut, surtout du fait qu'il existe un certain rapport entre la virulence du coli-bacille et la lésion histologique de la paroi intestinale dont la circulation sanguine est altérée, j'ai exécuté 13 expériences de la façon suivante :

Je retirais par un tube effilé, de la cavité appendiculaire d'un lapin sain, chloralisé, un peu de contenu que j'ensemençais en bouillon de bœuf et en gélatine qu'on coulait en plaques ; j'en isolais ensuite une variété type du coli-bacille, dont la virulence était déterminée. Ayant fermé par un point de suture la petite plaie provenant de la piqûre, je plaçais le mésappendice entre deux bandes en caoutchouc, fixées par des sutures, traversant les deux bandes et le mésappendice entre les vaisseaux à direction perpendiculaire à l'axe longitudinale de l'appendice. En serrant et resserrant les nœuds de ces sutures, on exerçait une pression voulue sur les vaisseaux. Quelquefois on ajoutait à ce procédé une ligature complémentaire de quelques vaisseaux artériels ou veineux de l'appendice; le plus souvent je faisais la ligature de la grande veine marginale de l'appendice.

Après, suivant l'expérience, on procédait de deux façons : dans une série d'expériences on fermait la cavité appendiculaire par une ligature en caoutchouc, dans une autre on la

laissait ouverte. Les vivisections ont été faites d'une façon strictement aseptique.

Il est vrai que ce n'est pas toujours qu'on obtient par ce procédé l'altération voulue de la circulation sanguine dans la paroi appendiculaire. Les adhérences péritonéales qui sont ici la règle modifient souvent le résultat visé de l'expérience, en ajoutant par leur rétraction à la compression artificielle des vaisseaux une compression naturelle. Il faut tenir compte de ce fait, surtout si on veut provoquer une altération relativement légère, par exemple une hypérémie veineuse de moyenne intensité, sans foyers nécrotiques. Cependant on parvient toujours, dans une série d'expériences, à provoquer la prédominance de l'altération voulue.

Dans la majorité des expériences l'animal succombait à la suite de l'opération. On ouvrait alors l'abdomen le plus tôt possible après la mort, et on retirait de nouveau de la cavité appendiculaire un peu du contenu pour en isoler la même variété du coli-bacille (par le procédé indiqué dans mon étude antérieure. — Voir *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895), et comparer sa virulence avec celle du microbe retiré de l'appendice sain. Quelquefois l'animal survivait; alors on le sacrifiait quand la maladie était apparente et on examinait le contenu appendiculaire de la même façon. Pour déterminer la virulence du coli-bacille, je me servais de cobayes et de jeunes lapins; on déterminait la dose mortelle minima d'une injection intrapéritonéale d'une culture en bouillon de bœuf de 24 heures.

Dans les expériences avec occlusion de l'appendice cæcal, il ne se produisait nul déplacement de son contenu, de sorte que les changements des propriétés vitales des microbes se sont accomplies pour sûr ici même, dans la cavité appendiculaire. Mais quant aux expériences où la cavité appendiculaire est restée ouverte, on pourrait faire l'objection que la flore bactérienne de l'appendice a pu changer à cause de la circulation fécale qui persistait. Je ne crois pas que cette objection soit juste; les animaux en expérience étaient mis à jeun pendant 24 heures avant l'opération, leur intestin se trouvait donc dans un état de repos : ensuite, il se produisait dans ces expériences toujours une péritonite, dont l'influence paralysante sur l'intestin est bien connue; enfin, tenant compte de la susdite objection, je

retirais toujours le contenu de la partie la plus profonde de la cavité appendiculaire, tout près du bout en cul-de-sac de l'organe, où le déplacement des masses fécales est le plus difficile.

Dans toutes les expériences, on constatait des lésions profondes de l'appendice, analogues à celles qu'on observe dans l'appendicite suppurée ou gangréneuse de l'homme : hypérémie et stase veineuse avec ou sans nécrose, infiltration leucocytaire et hémorragique de la paroi intestinale. nécrose et desquamation de la couche épithéliale, quelquefois nécrose de toute la muqueuse, folliculite circonscrite ou diffuse, altérations de la séreuse appendiculaire, anémie, gangrène et perforation de la paroi intestinale; quelquefois on trouvait aussi des petits abcès périappendiculaires.

Le contenu de l'appendice se présentait sous divers aspects : souvent il était sanguinolent, quelquefois brunâtre, stercoral. Il renfermait toujours des globules blancs en grande quantité et des hématies rouges; une fois, il était parfaitement purulent. Parmi les microbes, le coli-bacille se trouvait toujours en grande abondance ; quelquefois il se développait sur gélatine en culture pure.

La lésion histologique de l'appendice étant souvent compliquée, ce n'est pas toujours qu'on trouve dans sa cavité précisément le genre de contenu auquel on s'attend d'après l'altération macroscopique de la paroi. Dans les cas de stase veineuse prononcée, on constate le plus souvent un contenu liquide, sanguinolent ; mais on trouve aussi quelquefois en pareils cas un contenu liquide ou presque liquide, d'une couleur brunâtre ou semblable à celle du café au lait; ce genre de contenu renferme aussi une certaine quantité de globules rouges et de cristaux d'hémoglobine, mais surtout il est riche en globules blancs. Dans ces cas. l'altération du contenu provoquée par la stase veineuse est combinée avec celle due à l'inflammation de la paroi appendiculaire et qui peut même la masquer. Dans les expériences, où l'altération prédominante de la paroi appendiculaire est une anémie, on constate le plus souvent un contenu stercoral; mais on y trouve aussi des hématies rouges en petite quantité, ce qui correspond aux hémorragies qu'on trouve dans la paroi. et des globules blancs qui sont parfois si nombreux que le contenu appendiculaire devient purulent.

Pour démontrer les variations de la virulence du coli-bacille dans l'appendicite, je vais reproduire en résumé quelques-unes de mes expériences, sans citer celles qui ont donné des résultats analogues.

Expérience *a*.

On retire un peu de contenu de la partie terminale de l'appendice. Compression des vaisseaux du mésappendice par des bandes en caoutchouc; ligature de quelques petites veines. La cavité appendiculaire reste ouverte.

Mort de l'animal en 3 jours après l'opération. La cavité péritonéale renferme un liquide séro-fibrineux avec très peu d'hématies. On trouve l'appendice entouré par les anses intestinales voisines, avec lesquelles il est légèrement soudé. L'appendice est d'un rouge foncé ; on voit dans sa paroi quelques petits foyers nécrotiques, correspondant aux vaisseaux fermés par la ligature. L'appendice n'est pas perforé. 5 centimètres au-dessus de son bout on voit une légère impression de la paroi, sans que la cavité appendiculaire soit fermée. La muqueuse est hyperémiée et œdémateuse, d'un brun foncé. Dans la partie supérieure de l'appendice apparaît un tout petit abcès de la paroi. On trouve dans la cavité appendiculaire un liquide sanguinolent qui imbibe quelques masses fécales. On prend une goutte de ce liquide pour l'examen bactériologique.

Examen histologique. Nécrose et desquamation de la couche épithéliale. Nécrose centrale des follicules. Dilatation des vaisseaux, infiltration leucocytaire et hémorragique de la muqueuse, submuqueuse et subséreuse ; ces lésions sont beaucoup moins prononcées dans la tunique musculaire. Desquamation de l'endothèle péritonéal.

Virulence du coli-bacille, retiré de l'appendice sain :

Dose mortelle minima, tuant un cobaye de 650-700 grammes en 24 heures : 3 c. c. d'une culture en bouillon de bœuf de 24 heures (2,5 c. c. de la même culture tuent un animal de même poids en 7 jours.

Virulence de la même variété du coli-bacille, retiré de l'appendice pathologique : dose mortelle minima, tuant l'animal en 24 heures : 2 c. c. (1,75 c. c. de la même culture ne produit qu'une maladie passagère ; chez un cobaye femelle, cette dose provoque un avortement).

Dans cette expérience, la virulence du coli-bacille, faible à l'état normal, fut exaltée en conditions pathologiques sans occlusion de la cavité appendiculaire.

Expérience *b*.

Compression des vaisseaux du mésappendice par des bandes en caoutchouc, ligature de la grande veine marginale ; au cours de l'expérience, la coloration de l'appendice devient livide. On laisse la cavité appendiculaire ouverte.

Mort en 3 jours. On trouve dans la cavité péritonéale un liquide sanguinolent en petite quantité ; parmi les microbes qu'il renferme, les plus nom-

breux sont des coccus. L'appendice cæcal se présente tout de suite après l'ouverture de l'abdomen ; les adhérences péritonéales qui l'entourent sont très faibles. Il n'y a pas la moindre torsion ni étranglement, ni perforation de l'appendice.

La coloration de l'appendice est d'un rouge foncé. La muqueuse, très rouge, œdémateuse. Lésions histologiques analogues à celles de l'expérience *a*. Le contenu de l'appendice est presque liquide, d'une coloration de café au lait ; il renferme des globules blancs en énorme quantité et des hématies rouges.

Virulence du coli-bacille retiré de l'appendice sain :

Dose mortelle minima, tuant un cobaye de 450-500 grammes en 20 heures : 0,75 c. c. d'une culture en bouillon de bœuf de 24 heures.

Virulence du même bacille, retiré de l'appendice pathologique : dose mortelle minima : 0,25 c. c. d'une culture analogue.

Dans cette expérience, la virulence du coli-bacille, retiré de l'appendice pathologique, est 3 fois plus grande que celle du même bacille retiré de l'appendice normal. Le coli-bacille a exalté sa virulence dans un appendice à cavité ouverte.

Expérience *c*.

Compression des vaisseaux du mésappendice par des bandes en caoutchouc, ligature de la veine marginale. Le contenu de l'appendice normal est liquide, jaunâtre. On laisse la cavité appendiculaire ouverte.

Mort en trois jours. Péritonite septique aiguë. L'appendice, très hypérémié, est fixé au centre d'un paquet d'anses intestinales voisines par de fortes adhérences péritonéales ; en quelques endroits il est étranglé par ces adhérences, de sorte que sa cavité est fermée. Le contenu appendiculaire est sanguinolent. La folliculite est très prononcée dans cette expérience.

Le coli-bacille, dont la dose mortelle minima pour un jeune lapin de 650-700 gr., tuant l'animal en 24 heures, était à l'état normal 1,75 c. c. d'une culture en bouillon de bœuf de 24 heures, n'a pas exalté sa virulence dans cette expérience en conditions pathologiques, malgré la stase veineuse prononcée de la paroi appendiculaire et le caractère sanguinolent de son contenu.

Expérience *d*.

Ligature de plusieurs petits vaisseaux (artères et veines) du mésappendice et de la grande artère marginale.

Rupture de la veine marginale, hémorragie, par conséquent anémie très prononcée de l'appendice cæcal. On ferme la cavité appendiculaire par une ligature en caoutchouc.

Pendant 4 jours après l'opération, l'animal ne semble pas souffrir ; le seul symptôme pathologique est l'anorexie. Son poids tombe de 1,700 à 1,410 grammes. Le 5e jour apparaissent des symptômes graves, l'animal est sacrifié.

A l'autopsie, on trouve une péritonite adhésive périappendiculaire. Les adhérences péritonéales entre les anses intestinales qui entourent l'appendice cæcal sont très fortes. L'appendice n'est pas perforé. Il est très anémique, d'un gris verdâtre, sa cavité est dilatée. Il renferme un contenu peu abondant, liquide, stercoral, d'un brun foncé, et un gaz très fétide en grande quantité. Dans le contenu liquide on constate, à côté des éléments ordinaires, des globules blancs en grande quantité, quelques hématies rouges et quelques cristaux d'hémoglobine. Nécrose de presque toute la muqueuse; dans les restes de cette tunique et dans la submuqueuse, on constate quelques hémorragies, mais surtout une infiltration leucocytaire. Les fibres de la tunique musculaire sont dissociées, leur noyaux se colorent mal ou ne se colorent pas du tout. Desquamation complète de l'endothèle de la séreuse appendiculaire, couverte presque totalement par un exsudat plastique.

Virulence du coli-bacille retiré de l'appendice sain : dose mortelle minima tuant un jeune lapin de 750-800 grammes en 14-15 heures est 2,25-2,5 c. c. d'une culture en bouillon de bœuf de 24 heures (quelques animaux ont résisté à l'injection intrapéritonéale de 2,25 c. c. de cette culture).

Virulence du même bacille, retiré de l'anse pathologique. Dose mortelle minima 2,25 c. c. d'une culture analogue.

Dans cette expérience, où on avait provoqué une anémie de la paroi d'un appendice, dont la cavité fut fermée, le coli-bacille n'a pas exalté sa virulence.

Expérience *e*.

Compression des vaissaux du mésappendice par des bandes en caoutchouc. Ligature complémentaire de quelques-uns de ces vaisseaux. On ferme le canal appendiculaire par une ligature en caoutchouc; il se produit une anémie prononcée de la paroi appendiculaire. L'animal se porte bien pendant deux jours après l'opération. Le 3e jour, le lapin est moribond; il est sacrifié.

A l'autopsie, on trouve l'appendice très anémique, très adhérent aux anses intestinales voisines. On constate quelques petits foyers nécrotiques de la paroi non perforée. La cavité appendiculaire ne renferme que très peu de gaz et des masses stérocales qui diffèrent peu du contenu du même appendice à l'état normal.

Virulence du coli-bacille retiré de l'appendice sain : dose mortelle minima, tuant un cobaye de 700-750 grammes en 20 heures, est 2,5-3 c. c. d'une culture en bouillon de bœuf de 24 heures (quelques animaux supportent une injection intrapéritonéale de 2,5, même de 2,75 c. c. de cette culture).

Dose mortelle minima du même microbe retiré de l'appendice pathologique, 2,5-3, c. c. d'une culture analogue (quelquefois une dose de 2,5 c. c. de cette culture ne provoquait qu'une maladie passagère).

Dans cette expérience, la virulence du coli-bacille, faible en

conditions normales, n'a subi aucune exaltation dans un appendice anémique, dont la cavité fut fermée.

Expérience *f*.

Compression des vaisseaux du mésappendice (artères et veines) par des bandes en caoutchouc et ligature complémentaire de quelques-uns de ces vaisseaux. Le contenu retiré de la cavité appendiculaire est assez épais, d'un brun verdâtre. On laisse la cavité appendiculaire ouverte. L'animal est sacrifié 4 jours après l'opération. A l'autopsie, on trouve une péritonite périappendiculaire; l'appendice cæcal est libre, sa cavité est restée ouverte. L'examen histologique relève une desquamation de la couche épithéliale, hyperémie de la muqueuse et submuqueuse; on constate dans ces tuniques quelques hémorragies, mais la lésion prédominante est une infiltration leucocytaire; on en trouve aussi dans les autres tuniques de la paroi intestinale. La cavité appendiculaire est remplie de pus. A l'examen microscopique, on trouve dans ce pus des bâtonnets à bouts arrondis en énorme quantité. On cultive de ce pus le coli-bacille en culture pure.

Virulence du coli-bacille retiré de l'appendice sain : dose mortelle minima tuant un jeune lapin de 1,100-1,200 grammes, en 22 heures : 5 c. c. d'une culture en bouillon de bœuf de 24 heures. La même dose d'une culture analogue du même bacille retiré du pus appendiculaire ne tue un jeune lapin du même poids qu'en 80 heures.

Dans cette expérience, où la cavité appendiculaire est restée ouverte, on a réussi à provoquer une appendicite suppurée très nette par une altération de la circulation sanguine dans la paroi intestinale. La virulence du coli-bacille retiré du pus appendiculaire était, dans cette expérience, inférieure à celle du microbe, retiré de l'appendice sain.

On voit par ces recherches que dans un procès pathologique expérimental qui entraîne des altérations histologiques analogues à celles qu'on constate souvent dans l'appendicite de l'homme, le coli-bacille exalte quelquefois sa virulence.

Il ressort de ce fait que le coli-bacille n'est pas un saprophyte banal, mais qu'il peut exercer une action pathogène au cours d'une appendicite; bien entendu il est parfaitement admissible que d'autres microbes intestinaux, aérobies ou anaérobies, agissent en même temps.

Une exaltation de la virulence du coli-bacille se produisait dans ces expériences seulement dans le cas où la lésion prédominante de la paroi appendiculaire se caractérisait par une stase veineuse prononcée. Une seule fois (expérience *c*) où cette altération existait, la virulence du coli-bacille n'était pas exaltée; il

faut expliquer ce fait par la multiplicité des influences que subissent les microbes en pareilles conditions, influences qui peuvent se neutraliser réciproquement. Dans les cas où la paroi appendiculaire était anémique, on ne trouvait jamais la virulence du coli-bacille exaltée.

Il résulte donc de ces expériences, pour l'appendice cæcal, le même rapport entre l'altération de la paroi et la virulence du coli-bacille que j'ai constatée en 1895 pour l'intestin grêle.

D'autre part, je n'ai pu constater nulle relation entre la virulence du microbe et l'occlusion de la cavité appendiculaire : je trouvais une exaltation de la virulence du coli-bacille dans une cavité appendiculaire ouverte, et je ne la trouvais pas dans les cas où la cavité appendiculaire était close. Cependant, comme la virulence du coli-bacille dépend d'autres agents, dont un paraît ressortir de ces expériences, et comme les résultats de mon étude antérieure sur le coli-bacille démontrent que ce microbe peut exalter sa virulence dans une anse intestinale fermée, il est évident qu'il le peut également dans une cavité appendiculaire close, par exemple dans un appendice étranglé, avec stase veineuse prononcée de sa paroi.

L'expérience *f* démontre qu'on peut provoquer chez le lapin une appendicite suppurée sans occlusion de la cavité appendiculaire. Il est très intéressant que précisément dans cette expérience la virulence du coli-bacille non seulement n'était pas exaltée, mais au contraire qu'elle était inférieure à celle du même microbe isolé du contenu de l'appendice sain. D'après MM. Roger et Josué, l'appendicite suppurée expérimentale n'est pas due à une exaltation de la virulence des microbes intestinaux, mais elle résulte de l'accumulation des produits microbiens dans la cavité appendiculaire. L'expérience *f* démontre qu'en effet il peut éclater une appendicite suppurée sans exaltation de la virulence du coli-bacille. Les résultats des recherches de MM. Veillon et Zuber, s'appliquant surtout à la forme gangréneuse de l'appendicite, les propriétés pyogènes du coli-bacille, si bien connues, la prédominance de ce microbe, dans l'expérience *f*, dans le pus appendiculaire, et son développement en culture pure sur plaques de gélatine ensemencées avec ce pus, nous conduisent à la conclusion que dans cette expérience le coli-bacille avait exercé une action pathogène. Mais la virulence de ce microbe n'étant pas exaltée, com-

ment expliquer son rôle pathogène? Faut-il recourir à l'hypothèse de l'accumulation des produits toxiques de ce microbe, due à la stagnation du contenu appendiculaire?

Je suis parfaitement d'accord avec MM. Roger et Josué que, pour expliquer l'appendicite, il n'est pas nécessaire d'invoquer pour tous les cas une exaltation de la virulence des microbes intestinaux ; je l'ai constaté dans plusieurs expériences. Mais en même temps je pense qu'il n'est pas nécessaire non plus d'invoquer exclusivement l'accumulation des sécrétions bactériennes par stagnation du contenu de l'appendice, due à une occlusion de sa cavité. Dans les cas analogues à l'expérience *f*, il suffit de tenir compte du fait, qu'un microbe comme le coli-bacille, qui possède même à l'état de saprophyte une certaine virulence, peut sans l'exalter exercer une action pathogène sur un organe à moindre résistance. Cette explication a déjà été appliquée théoriquement à la pathogénie de l'appendicite par M. Talamon. L'expérience *f* parle en faveur de cette explication.

Dans l'expérience *f*, la virulence du coli-bacille isolé de l'appendice pathologique était inférieure à celle du microbe retiré de l'appendice sain. Le contenu de l'appendice pathologique étant ici constitué par du pus, il faut chercher l'explication de ce fait dans les substances bactéricides dérivant de la leucolyse, et qui peut-être sont aussi sécrétées par les globules blancs vivants. Cependant ce n'est pas dans tous les cas où les globules blancs sont très nombreux dans le contenu appendiculaire que la virulence du coli-bacille est atténuée; on constate en pareils cas quelquefois même une exaltation de la virulence du coli-bacille (expérience *b*). On trouve une explication de ce fait dans la complexité d'influences chimiques et biologiques, exercées en pareilles conditions sur le microbe. Ces influences, dont le caractère, l'intensité, le moment et la durée sont différents, peuvent se combiner de diverses façons, et ce n'est que leur ensemble qui se traduit comme altération des propriétés vitales du microbe.

*
* *

La question du passage des microbes à travers la paroi intestinale n'est pas encore résolue d'une façon définitive. D'après les recherches plus anciennes, les microbes traversent assez facilement la paroi intestinale en conditions pathologiques, tandis

que d'après les recherches de date plus récente le passage des microbes n'est possible qu'à travers une paroi présentant de graves altérations histologiques. Tout le monde est d'accord que les microbes traversent les foyers nécrotiques de la paroi intestinale ; mais on n'est pas encore fixé sur le passage des microbes à travers la paroi intestinale pathologique, mais non nécrosée, sur la résistance des différentes tuniques intestinales vis-à-vis les microbes.

D'après MM. Grawitz [1] et Okar-Blom [2], c'est la séreuse intacte qui constitue pour les microbes la barrière la plus difficile à franchir. Les expériences de M. Pawlowsky [3] ont démontré qu'une lésion chimique de cette tunique ne suffit pas pour provoquer un passage des microbes à travers l'anse altérée. M. Korkunoff attribue un rôle important à la couche épithéliale. En étudiant le passage des microbes à travers la paroi d'une anse intestinale étranglée, j'ai constaté (voir ces *Annales*, 1895, p. 734) que dans les cas où les microbes envahissent la paroi intestinale dans toute son épaisseur, « c'est la tunique musculaire qui paraît être la couche la plus résistante ». Dans une étude expérimentale plus récente, M. Tschistowitsch [4] arrive à la conclusion que la séreuse intacte ne constitue pas la seule barrière pour les microbes traversant la paroi intestinale, et que son rôle protecteur est le même que celui de la tunique musculaire et de la muqueuse.

D'après les observations de M. Bizzozero [5], confirmées par celles de MM. Ribbert et Ruffer, et de M. Sundberg [6], on trouve des microbes intestinaux dans la muqueuse de l'appendice cæcal du lapin, même à l'état normal. En étudiant la paroi de l'appendice normal du lapin en préparations fixées au sublimé et colorées par la thionine, je suis arrivé à la conclusion que ce n'est pas toujours qu'on y relève des microbes. En tout cas, la quantité des microbes constatés dans une paroi appendiculaire

1. Grawitz, *Charité-Annalen*, XI Jhrg., 1886.
2. Okar-Blom, *Centralbl. f. Bact. u. Parasit*, t. XV, 1893, n° 16.
3. Pawlowsky, Zur Lehre von der Aetiologie, der Entstehungsweise und d. Formen d. acuten Peritonitis, *Virchow's Archiv.*, t. CXVII, 1889.
4. Tschistowitsch, Uber die Durchdringlichkeit der Darmwand für Mikroorganismen bei experim. Peritonitis, *Centralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anatomie* 1889, n° 137.
5. Bizzozzero, *Centralbl. f. d. med Wiss.*, 1885, n° 45.
6. Sundberg, Upsala 1892.

normale, est négligeable en comparaison avec celle qu'on y trouve en conditions pathologiques.

MM. Roger et Josué ont trouvé que, dans l'appendicite suppurée du lapin, les microbes intestinaux ne pénètrent pas dans la paroi; qu'ils s'y trouvent toujours en petit nombre et ne se rencontrent que dans les parties nécrosées.

Dans l'expérience *f* (appendicite suppurée), je n'ai trouvé des microbes (coli-bacilles?) que dans les couches superficielles, nécrosées de la muqueuse. Le résultat de cet examen confirme donc parfaitement l'opinion de MM. Roger et Josué. Mais dans l'appendicite gangréneuse, que j'avais provoquée dans la majorité de mes expériences, je trouvais constamment des microbes dans la paroi intestinale. C'étaient surtout les parties nécrosées qui étaient envahies par les microbes; on les trouvait aussi dans les vaisseaux et dans les foyers hémorragiques où ils étaient quelquefois très nombreux. Dans la plupart des expériences, on trouvait des microbes dans les follicules appendiculaires; mais ils étaient ici beaucoup moins nombreux que dans le tissu interfolliculaire qui leur servait de voie de propagation.

Dans les appendices dont la muqueuse et la submuqueuse étaient envahies par les microbes, on n'en trouvait relativement que très peu dans la tunique musculaire. Dans les cas où ils étaient moins nombreux dans la muqueuse et la submuqueuse, ils faisaient défaut dans la tunique musculaire. Ce fait démontre la résistance de cette tunique au passage direct des microbes intestinaux et confirme les résultats de mes recherches antérieures.

*
* *

Sans perdre de vue la différence qui existe entre une lésion artificielle de l'appendice cæcal du lapin, qui est chez cet animal un organe bien développé, et l'affection naturelle du rudimentaire appendice de l'homme, je pense qu'on peut appliquer quelques conclusions générales, ressortant de ces recherches, à la pathogénie de l'appendicite.

D'après les observations de M. Ribbert [1], l'appendice cæcal est souvent vide. J'ai pu constater sur quelques dizaines d'appendices humains, qui ont été gracieusement mis à ma disposition

1. RIBBERT, Beiträge zur normalen und pathol. Anatomie d. Wurmfortsatzes, *Virchow's Archiv.*, t. CXXXII, 1893.

par l'Institut d'anatomie pathologique de Cracovie, qu'on trouve en effet, à côté des appendices dont le contenu stercoral ou muqueux est assez copieux, des appendices dont le contenu est très peu abondant. Mais on y trouve toujours des microbes et le coli-bacille n'y manque jamais. Une infection de l'appendice cæcal par ce bacille est donc toujours possible.

Dans l'appendicite expérimentale du lapin, le coli-bacille exalte sa virulence en certaines conditions pathologiques. Il est parfaitement admissible qu'en conditions analogues il le fait également dans l'appendicite de l'homme.

J'ai pu constater dans ces expériences un certain rapport entre l'exaltation de la virulence du coli-bacille et les altérations de la paroi appendiculaire dues à une stase veineuse; dans l'appendicite de l'homme, on trouve souvent des lésions analogues. Dans la majorité des cas, ces lésions sont secondaires; elles succèdent à l'infection de l'appendice et sont la conséquence d'une péritonite périappendiculaire plastique qui provoque des altérations de la circulation sanguine dans la paroi appendiculaire par formation d'adhérences et de brides péritonéales. Dans ces cas, une exaltation secondaire de la virulence du coli-bacille peut aggraver l'infection appendiculaire. Quelquefois l'appendicite est provoquée par une torsion ou par un étranglement de l'appendice cæcal ou de son mésentériole; dans ces cas, les altérations de la circulation sanguine précèdent l'infection appendiculaire; si le coli-bacille exalte sa virulence, l'infection est rendue plus facile.

Un corps étranger ou un calcul stercoral peut également provoquer des altérations locales de la circulation sanguine par compression et distension de la paroi appendiculaire. Dans les stades avancés de l'appendicite, l'accumulation du contenu appendiculaire peut agir de la même façon. Les procès pathologiques aboutissant à la formation d'un tissu fibreux dans la paroi appendiculaire ont le même effet. En un mot, il existe dans la pathogénie de l'appendicite toute une série d'agents qui peuvent influencer la virulence du coli-bacille par altération de la circulation sanguine dans la paroi appendiculaire.

A côté de cette influence sur la virulence du coli-bacille il en existe d'autres, dont on connaît déjà quelques-unes; ces agents peuvent également jouer un rôle dans la pathogénie de l'appen-

dicite. MM. Lesage et Macaigne ont trouvé que le coli-bacille exalte sa virulence dans les affections catarrhales de l'intestin. Pour beaucoup d'auteurs l'appendicite est en rapport intime avec l'entérite. Il est donc possible qu'une exaltation de la virulence du coli-bacille dans la cavité appendiculaire se produise quelquefois par propagation d'une affection catarrhale du gros intestin sur la muqueuse de l'appendice. De même, un coli-bacille à virulence exaltée dans une autre partie de l'intestin peut s'introduire et se fixer dans la cavité appendiculaire. Il est également admissible que, dans les appendicites épidémiques encore peu étudiées, il se produit une altération des propriétés vitales des microbes intestinaux, due à une infection qui influence leurs relations symbiotiques.

Il résulte de mes expériences que chez le lapin l'occlusion de la cavité appendiculaire n'est pas indispensable pour que le coli-bacille y exalte sa virulence et pour qu'une appendicite éclate. Dans ces dernières années, on a observé chez l'homme toute une série de cas d'appendicite avec cavité appendiculaire ouverte. D'autre part, on sait que les oblitérations de l'appendice cæcal sans procès inflammatoire de la paroi ne sont pas rares, surtout chez les individus âgés. M. Ribbert les a constatées sur 400 observations, 99 fois; dans la majorité des cas, c'étaient des oblitérations partielles: des oblitérations totales se trouvaient dans 3 1/3 0/0 des cas. Les hydropisies de l'appendice cæcal, où cet organe est transformé en un kyste dont le contenu liquide n'exerce qu'une action mécanique sur la paroi intestinale, parlent aussi en faveur de l'opinion qu'une occlusion de l'appendice cæcal ne provoque pas toujours une infection de cet organe. La stagnation du contenu appendiculaire joue sans doute un certain rôle dans la pathogénie de l'appendicite; mais, excepté le contenu gazeux, elle se produit dans les stades avancés de toute appendicite, avec ou sans occlusion du canal, par paralysie de la paroi appendiculaire. L'occlusion du canal appendiculaire ne peut donc jouer un rôle prédominant dans la pathogénie de toute appendicite.

Il résulte également de mes expériences qu'il peut éclater une appendicite suppurée avec prédominance du coli-bacille dans le pus appendiculaire sans exaltation de la virulence de ce microbe, par simple altération de la nutrition de la paroi appendiculaire.

De là, il ressort pour la pathogénie de l'appendicite l'importance de la moindre résistance du milieu intérieur. D'après les observations de M. Kümmel[1] et de M. Sonnenburg[2], l'appendicite aiguë éclate toujours dans un organe dont la paroi est altérée par des procès pathologiques chroniques; il est fort probable que ces procès entraînent la moindre résistance de la paroi appendiculaire. Le rôle de cet agent devient pour toutes les infections de plus en plus évident. Pour l'appendicite non spécifique, son importance est d'autant plus grande que l'infection est dans cette affection toujours secondaire.

Ces recherches n'aboutissent pas à une nouvelle théorie générale de l'appendicite. Au contraire, tenant compte des variations que subit en conditions pathologiques la virulence des microbes intestinaux et la résistance de la paroi appendiculaire, je pense que la pathogénie de l'appendicite est, suivant les cas, différente. Plus on étudie les polyinfections non spécifiques, plus on arrive à la conclusion que les procès morbides qu'elles provoquent sont dus à toute une série d'agents pathogènes de différents ordres, dont la complexité ne permet pas de les renfermer dans les cadres d'une théorie générale.

Cracovie, décembre 1898.

1. Kummel, *l. c.*
2. Sonnenburg, Neuere Erfahrungen über Appendicitis, *Mittheilungen auf d. Grenzgebieten d. Med. u. Chir.*, t. III, 1898.

SUR LES MUCÉDINÉES THERMOPHILES

Par Mlle P. TSILINSKY

C'est en 1879 que M. Miquel (1) découvrit dans l'eau de Seine un bacille immobile, capable de vivre et de se développer à la température de 70° C. Plus tard M. Van Tieghem (1881) (2) mentionna un streptocoque et un bacille thermophiles, capables de vivre encore à 74° C., et depuis, une foule de travaux, (P. Miquel (3), Globig (4), L. Rabinowitch (5), Macfadyen et Blaxall (6), Karlinski (7), Certes et Garrigou (8), Jeich (9), et d'autres, ont montré que les bacilles thermophiles sont largement répandus.

On n'a trouvé tout d'abord chez eux que des formes bactériennes ordinaires. C'est seulement l'an dernier que M. Kedzior décrivit le premier *Cladothrix thermophile*, isolé de l'eau des égouts et se développant entre 35° et 65°.

Ce nom de *Cladothrix* ne semble pas juste pour une espèce qui ne présente ni fausse ramification ni gaine commune à un grand nombre d'articles; il semble plutôt qu'on ait affaire à un *Streptothrix* (Cohn) dont les individus se caractérisent par une vraie ramification, par la formation des spores à l'extrémité des filaments et par l'absence d'organes spéciaux de fructification. Notons pourtant que ce genre *Streptothrix* est fort discuté : un désaccord existe sur la désignation à donner aux organismes en question et sur la place qu'ils occupent dans le système microbien. M. Cohn, faisant en 1875 l'étude d'un microbe[1] formant des filaments rappelant de très près le mycélium d'une mucédinée inférieure, hésita à le classer parmi les champignons, et lui assigna une place à part, en le désignant sous le nom de *Streptothrix*.

MM. Sauvageau et Radais ont proposé de remplacer ce nom par celui de *Oospora*; MM. Toni et Trévisan par celui de *Nocardia* (en l'honneur de M. Nocard, qui découvrit le microbe du « Farcin du bœuf »); Gasperini par celui d'*Actinomyces;* M. Werestneff, dans la monographie nouvellement parue sur l'actinomycose, soutient cette dernière dénomination.

1. Il s'agit du microbe découvert par MM. Graefe et Forster dans le canal lacrymal de l'homme.

Enfin d'autres mycologues, parmi lesquels se trouve le savant allemand Fischer, prétendent que les formes en question seraient des formes de souffrance de diverses mucédinées supérieures, ayant perdu leurs organes spéciaux de fructification par suite de l'influence des milieux. Nous nous arrêterons au nom d'« Actinomyces », choisi par Gasperini.

*
* *

Dans mes recherches sur les bactéries thermophiles, j'ai rencontré deux espèces d'actinomyces végétant entre 48° et 68°.

Voici comment je les ai isolées : on ensemençait sur pommes de terre des parcelles de terre ou de fumier ; puis on les plaçait dans l'étuve à une température de 53-55° C. Au bout de 16 heures on observait sur différents endroits de la surface des pommes de terre une couche blanche, pulvérulente, entremêlée de nombreuses colonies de bacilles thermophiles, dont il est facile d'isoler deux espèces à l'aide de plaques de gélose maintenues à une température de 55-57°.

Le thermoactinomyces isolé de la terre présente des filaments ramifiés larges à peu près de de 0,5 μ (fig. 6). Il forme facilement des spores sur tous les milieux nutritifs, surtout sur la pomme de terre. Les spores apparaissent au bout des filaments sous forme de renflements ronds ou ovoïdes (fig. 5).

Ces renflements grossissent, et les spores, devenues tout à fait mûres, se séparent des filaments.

Le mycélium se colore facilement par les couleurs d'aniline et par le Gram. Il en est de même pour les spores tant qu'elles ne se sont pas séparées des filaments; mûres et détachées, elles restent incolores, sauf une petite bordure qui prend la couleur.

Cet actinomyces est probablement très répandu dans la nature, je l'ai toujours rencontré dans les matériaux les plus variés, terres, foin, paille, différentes céréales, fumier, pomme de terre, etc. En raison de ce fait, je me permettrai de le désigner sous le nom de *thermoactinomyces vulgaris*.

Cette espèce croît dans les limites de 48° à 68° C. L'optimum de sa croissance est près de 57°. A 70° il ne pousse plus; à 37° et à plus forte raison à la température ordinaire, il peut rester inerte un mois, et pousser en 24 heures, quand on le transporte alors dans une étuve à 56-57° C. A 48° la croissance est très lente; on ne la voit guère qu'au bout de 3 jours.

Les spores ne périssent pas après 20 minutes à 100° à l'autoclave. Elles supportent aussi très bien l'action des substances désinfectantes ; l'acide phénique à 5 0/0 ne les tue pas au bout de 24 heures.

Le *thermoactinomyces vulgaris* se cultive bien sur tous les milieux ordinaires, liquides et solides.

C'est dans le bouillon qu'il pousse le mieux : au bout de 16 heures déjà, il donne une culture aussi abondante que celles que les *actinomyces* ordinaires ne donnent qu'au bout de 48 heures et plus. Macroscopiquement les cultures de ce champignon ne se distinguent en rien de celles des *actinomyces* ordinaires : on observe au fond du bouillon, qui reste limpide, de longs filaments spiralés fortement ramifiés, dont certains portent des spores à leur extrémité. On voit quelquefois apparaître à la surface du bouillon des colonies isolées d'un blanc neigeux, qui parfois confluent, formant ainsi une pellicule.

Sur la gélose (simple, glycérinée ou sucrée) il croît également très rapidement et abondamment, formant à la surface une espèce de poussière blanche, faite des spores et des filaments aériens du champignon.

La figure 3 représente une colonie de ce champignon à la grandeur normale ; elle est âgée de 4 jours.

Au nombre des propriétés biologiques du champignon il faut encore mentionner la propriété qu'il a de liquéfier la gélatine, de coaguler puis de liquéfier à nouveau le lait. La réaction du lait devient acide très prononcée ; la réaction de la gélatine ne change pas, restant légèrement alcaline. Il ne donne pas d'amylase ; on n'a pas constaté la réaction de l'indol dans des cultures anciennes. C'est un aérobie, car, ensemencé d'après la méthode de Liborius sur la gélose par piqûre, il ne croît qu'à la surface.

L'injection qu'on en a fait aux souris et aux cobayes, sous la peau et dans le péritoine, ne produisit aucun phénomène morbide local ou général.

*
* *

L'autre espèce thermophile d'*actinomyces*, que j'ai isolée du fumier, se distingue surtout de celle-ci par la largeur de ses filaments, qui atteignent de 1,2 μ à 1,5 μ (fig. 1). De plus ses spores se colorent entièrement, contrairement à celles du premier, même lorsqu'elles sont détachées des filaments ; les

spores se disposent très souvent en chapelets (fig. 2). Il ne liquéfie pas la gélatine après 4 semaines d'attente; il croît, bien que faiblement, à l'état d'anaérobiose ; ses spores sont moins résistantes vis-à-vis de la chaleur que celle du *Thermoactinomyces vulgaris*, et ne supportent pas la température de 100° pendant même 5 minutes, mais elles résistent à 80° à sec pendant 3 heures. La comparaison de ces deux *actinomyces* avec celui qu'a décrit M. Kedzior est difficile.

Mon *Thermoactinomyces vulgaris* ressemble à celui de M. Kedzior, par sa forme, le mode de formation des spores, leur manière de prendre la coloration.

Mais il s'en distingue en ce qu'il ne pousse pas à 35°, et en ce que la membrane formée à la surface du bouillon ne devient pas verdâtre et ne se disloque pas avec le temps, ce que M. Kedzior donne comme très caractéristique pour son champignon, qui, de plus, se distingue par une odeur particulière très marquée, tandis que les deux champignons que je viens de décrire sont inodores.

*
* *

Enfin j'ai réussi à isoler d'un échantillon de terre un microbe qui, d'après son organisation, est placé au-dessus de tous les microbes thermophiles décrits jusqu'ici. C'est une mucédinée supérieure, présentant un mycélium véritablement ramifié, et portant des conidies à l'extrémité des filaments [1]. Je ne suis pas parvenue à lui découvrir d'organes spéciaux de fructification, malgré de nombreux essais de culture sur les milieux les plus variés, à l'état aérobie et à différents degrés d'anaérobiose.

En attendant que j'en aie étudié la morphologie, je propose de lui donner le nom de *Thermomyces lanuginosus*, en raison de l'aspect duveteux qu'elle prend sur le pain blanc.

Ce champignon peut se cultiver entre 42° et 60° C., et n'est guère capable de se développer à 37°, et encore moins à la température ordinaire. Le fait de l'existence d'une mucédinée thermophile capable de végéter à une température si élevée est, je crois, nouveau; il est d'autant plus curieux que la plupart des mucédinées se cultivent le mieux à 20°, et que seules quelques

1. Je ne puis manquer d'exprimer à cette occasion ma profonde reconnaissance à M. le professeur Brefeld pour l'extrême obligeance qu'il a mise à examiner la culture et me donner son opinion à ce sujet.

formes pathogènes peu nombreuses ont l'optimum de leur croissance à 37°.

Le mycélium du champignon fut remarqué sur une pomme ensemencée avec des parcelles de terre du jardin. Pour le débarrasser des bactéries thermophiles qui l'accompagnaient, je le réensemençai d'abord sur une surface de pain blanc maintenue à 52-53°, où le champignon croît très abondamment, tandis que les bactéries se développent à peine. Après avoir fait ensuite des cultures en plaques de gélose de spores de ce champignon, j'ai obtenu ce dernier en culture pure. Ce champignon présente macroscopiquement un mycélium duveteux de couleur blanche ; sous le microscope on voit clairement de grosses spores, disposées au bout des filaments mycéliens ramifiés. (Fig. 7 et 8.) Ces derniers se colorent facilement avec toutes les couleurs d'aniline ainsi que par la méthode de Gram. Quant à ses propriétés biologiques, je me bornerai, pour le moment, aux remarques suivantes : il croît très bien sur tous les milieux nutritifs ordinaires, solides et liquides ; c'est sur du pain blanc qu'il croît le mieux. L'optimum de sa croissance est de 54-55° C. A 63°, et à 37° C. d'un autre côté, il ne se cultive pas ; à 42° la croissance a lieu, mais elle est relativement très faible. Au bout de 2 ou 3 jours, les spores apparaissent sur les milieux solides, tandis que dans les milieux liquides les plus divers l'apparition de ces spores n'a jamais été observée. Au fur et à mesure que le champignon continue à croître, son mycélium perd graduellement son aspect primitif duveteux, devient plus compacte et prend une teinte foncée. Les spores supportent sans gêne un chauffage à sec à 80° C. pendant 3 heures ; elles sont tuées au bout d'une minute à 100°. Le champignon liquéfie mais lentement la gélatine, et par conséquent possède le ferment protéolytique : il intervertit le sucre de canne, mais il ne manifeste pas d'amylase ; il coagule et éclaircit ensuite le lait, qui montre une réaction acide.

Ainsi nous voyons que le phénomène de thermobiose est largement répandu dans le règne végétal, et non seulement parmi les bactéries, mais aussi parmi les êtres relativement plus élevés, tels que les mucédinées.

Ce travail fut entrepris sur le conseil de M. Gabritschevsky, à qui j'en exprime ma sincère reconnaissance.

BIBLIOGRAPHIE

1. Miquel, *Bulletin de la statistique municipale de Paris*, n° de décembre 1879.

2. Van Tieghem, *Bulletin de la Société bot. de France*, janvier 1881, p. 35.

3. Miquel, Monographie d'un bacille vivant au delà de 70° C. — *Annales de micrographie*, 1888, n° 1, et *Annuaire de Montsouris*, 1881, page 464.

4. Globig, *Zeitschrift fur Hyg.*, Bd. III ; 1888.

5. L. Rabinowitsch, *Ibid.*, Bd. XX, 1893.

6. Macfadyen and Blaxall, *Journal of Bacteriology and Pathology*, Bd. III ; 1894.

7. Karlinsky, Zur Kenntniss der Bacterien der Thermalquellen, *Hygienische Rundschau*, 1898, n° 15.

8. Certes et Garrigou, *Comptes rendus*, t. CIII ; p. 703.

9. Jeich, Beitrag zur Kenntuiss therm. Bact., *Hyg. Rundschau*, 1896, n° 16.

10. Kedzior, Ueber eine termoph. Cladrothrix, *Arch. f. Hyg.*, XXVII Bd.

11. Gasperini, Ulteriori ricerche sul genere Actinomyces, Harz, Versuche uber das genus Actinomyces, *Cent. f. Bact. u. Parasit.*, Bd. XV ; p. 684.

12. Berestneff, *Sur l'actinomycose* (en russe), 1897.

13. Radais et Sauvageau, *Annales de l'Inst. Past.*, t. VI, p. 242.

14. Cité d'après le travail de MM. Radais et Sauvageau. *Ibid.*, p. 271 et 247.

15. Macé, *Traité de bactériologie*, 1897, p. 1024-1049.

16. Fischer, *Vorlesungen über Bacterien*, Iéna, 1897.

17. Cohn, Beitrage fur Biologie du Pflanzen, 1875.

18. Cohn, *Berichte der deutschen bot. Gesels*, 1893.

EXPLICATION DE LA PLANCHE IV

Fig. 1. Culture sur gélose, Thermoactinomyces II, coloration à la fuchsine, aqueuse. Gross. 800 fois.

Fig. 2. Culture sur pomme de terre, Thermoactinomyces II, Gross. 800 fois. Disposition des spores en streptocoques. Coloration au Gram.

Fig. 3. Une colonie de Thermoactinomyces vulgaris non colorée, grandeur naturelle.

Fig. 4. Une colonie de Thermoact. II, grandeur naturelle, non colorée.

Fig. 5. Les spores du Thermoact. vulgaris prises sur une culture en pomme de terre, gross. 800 fois, coloration à la fuchsine.

Fig. 6. Culture sur bouillon du Therm. vulgaris, coloration au Gram.

Fig. 7. Mycélium de la mucédinée thermophile ; culture sur du pain blanc, gross. 800 fois, coloration au Gram.

Fig. 8. Mycélium de la mucédinée thermophile; gross. 350 fois, coloration au Gram.

RECHERCHES SUR LES PROPRIÉTÉS NEUTRALISANTES
DE LA BILE A L'ÉGARD DU VIRUS RABIQUE

PAR M. H. VALLÉE,

RÉPÉTITEUR A L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

(Travail du laboratoire de M. le professeur Leclainche.)

Les recherches entreprises par Babès et Lepp [1], par Tizzoni et Schwarz [2], Tizzoni et Centanni [3], tendent à prouver qu'il existe une antitoxine dans le sang des animaux immunisés contre la rage. Plus récemment, les travaux de Calabrese [4] nous ont appris ce qu'avait d'incertain le pouvoir neutralisant des centres nerveux des animaux immunisés à l'égard du virus rabique.

M. Franzius d'autre part, dans un travail inspiré par les recherches de Robert Koch sur la propriété antitoxique de la bile dans la peste bovine, prétend que la bile des animaux morts de la rage contient une antitoxine rabique [5].

Tout d'abord, l'auteur constate que la bile des lapins enragés *n'est pas virulente*. Il étudie ensuite le pouvoir préventif de cette bile : des lapins reçoivent sous la peau, à plusieurs reprises, 0,50 à 1 c. c. de bile rabique; dix jours après la dernière inoculation de bile, les animaux sont inoculés sous la dure-mère avec une dose mortelle de virus fixe. Tous les lapins, sauf un, succombent à l'épreuve. La bile des animaux enragés ne possède donc pas de propriétés préventives.

Dans une seconde série d'expériences, Franzius inocule le virus dans la chambre antérieure de l'œil droit, tandis que l'œil gauche reçoit une égale quantité de bile rabique. Les animaux

1. BABÈS ET LEPP, Recherches sur la vaccination antirabique, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1889, p. 384.

2. TIZZONI ET SCHWARZ, La prophylaxie et la guérison de la rage par le sang des animaux vaccinés, *Annales de micrographie*, 1892, p. 169.

3. TIZZONI ET CENTANNI, Siero antirabbico ad alto potere immunizante applicabile all'uomo, *Riforma medica*, 27 décembre 1893.

4. CALABRESE, *Clinica moderna*, 11 et 18 janvier 1899, *Semaine médicale* n° 5, 1889.

5. FRANZIUS, Die Galle toller Tiere als Antitoxin gegen Tollwut, *Centralblatt fur Bakter.*, t. XXIII, p. 782.

inoculés dans ces conditions (quatre cobayes et cinq lapins) sont tous morts de la rage, mais moins rapidement que les témoins.

L'auteur inocule enfin sous la dure-mère de 9 lapins un mélange à volumes égaux de bile rabique et d'une émulsion de virus fixe (bile 0.2, émulsion de moelle allongée 0,2): les neuf animaux inoculés survivent.

La bile des animaux morts de la rage neutralise donc le virus rabique. Ce pouvoir, d'après Franzius, n'est pas dû à une simple action chimique : il s'agit là d'un *véritable pouvoir antitoxique, car la bile des animaux sains* (bœuf, porc, mouton), *mélangée au virus et inoculée dans les mêmes conditions, n'entrave nullement l'évolution de la rage.*

A priori, il nous a semblé surprenant que l'antitoxine rabique, si elle existe réellement dans la bile, exerce son action lorsqu'on l'introduit *sous la dure-mère mélangée au virus*, alors qu'elle reste inactive lorsqu'on l'inocule sous la peau à *titre préventif.*

Dans le but de vérifier les résultats de Franzius, nous avons entrepris une série d'expériences portant sur soixante lapins. Nous avons utilisé pour nos recherches du virus de diverses provenances, notamment celui obtenu par MM. Leclainche et Morel dans leurs inoculations intracérébrales en série. La bile de lapin a été seule employée; sa pureté au point de vue microbien était toujours contrôlée par l'ensemencement préalable d'une goutte de ce liquide; seules étaient utilisées les biles qui n'avaient pas donné de culture après 24 heures.

I. — *Pouvoir préventif de la bile de lapin enragé inoculée sous la peau.*

Dans la recherche de cette propriété, nous avons inoculé la bile de diverses façons :

A. A doses répétées de 1 à 4 c. c. plusieurs jours avant l'inoculation du virus dans l'œil ;

B. A dose forte variant de 1 à 3 c. c. en même temps que le virus était introduit dans la chambre antérieure de l'œil ou sous les méninges;

C. Les animaux reçoivent d'abord de la bile sous la peau, puis, plusieurs jours après, du virus rabique dans l'œil, et on continue à les soumettre à des injections de bile rabique pendant plusieurs jours.

Tous nos lapins sont morts, sauf un. *La bile des animaux morts de la rage est donc dépourvue de tout pouvoir préventif.* L'introduction de ce liquide sous la peau du lapin n'est pas toujours inoffensive; elle provoque souvent la mort du sujet par intoxication. Nous n'avons relevé aucune particularité dans la durée de l'incubation et la marche de la maladie chez les animaux traités; la rage évolue chez eux sensiblement comme chez les témoins.

II. — *Inoculations intracrâniennes du mélange de bile et de virus rabique.*

Nous avons constaté, comme Franzius l'a indiqué, que l'inoculation sous la dure-mère d'un mélange à volumes égaux d'une émulsion de virus rabique et de bile de lapin enragé ne tue pas les animaux.

INOCULATIONS SOUS LA DURE-MÈRE
20 *décembre* 1898

LAPIN N° 19	Mélange volumes égaux émulsion de bulbe, 3e passage, et bile, même lapin.	Survit.
LAPIN N° 20	Mélange, volumes égaux, bile et émulsion de bulbe lapin, rage 3e passage.	Survit.
LAPIN N° 21	Témoin, même virus pur, sous la dure-mère.	Mort le 30 déc. 10 jours.

Dès le début de nos essais de contrôle sur ce point, nous nous sommes heurté à une série d'accidents. Introduite sous la dure-mère, la bile rabique, comme la bile normale d'ailleurs, provoque l'apparition de phénomènes graves (coma, troubles épileptiformes), qui se terminent par la mort des animaux en un délai variable de quelques minutes à 48 heures.

Dans l'exposé de ses recherches, Franzius ne mentionne pas la possibilité de tels accidents; nous les avons attribués tout d'abord à quelque faute opératoire; plus tard, nous avons acquis la preuve qu'ils dépendent simplement de l'action spéciale qu'exerce la bile sur l'écorce cérébrale. Par ce mode d'inocula-

tion, il est impossible d'obtenir de belles séries : dans un seul essai, portant sur 13 lapins, nous eûmes 7 décès immédiats.

Nous avons tenté alors d'inoculer nos mélanges de bile rabique et de virus dans la chambre antérieure de l'œil; ce mode d'inoculation est, on le sait, presque aussi sévère que le dépôt du virus sous les méninges.

III. — *Inoculations intraoculaires.*

Huit lapins sont inoculés, dans la chambre antérieure de l'œil, avec un mélange à volumes égaux de bile de lapins enragés et de virus de provenances diverses. La bile et le bulbe employés dans une expérience déterminée sont prélevés sur le *même sujet*. L'inoculation du mélange est pratiquée après un temps de contact variable de quelques minutes à plusieurs heures. Nous laissons l'humeur aqueuse s'écouler par l'aiguille, aussi complètement que possible, avant de pousser l'injection : la quantité de matière inoculée, grâce à cette précaution, oscille entre 1/4 et 1/2 c. c.

INOCULATIONS INTRAOCULAIRES, VIRUS ET BILE RABIQUES

1er *février* 1899.

		CONTACT	
LAPIN N° 31	Mélange à volumes égaux, émulsion bulbe et bile lapin, rage, 6e passage.	45 min.	Survit.
LAPIN N° 32	Même mélange.	1 heure.	Survit.
LAPIN N° 33	Même mélange.	2 heures.	Survit.
LAPIN N° 34	Émulsion bulbe, rage, 6e passage.		Mort en 12 jours.

Les huit lapins inoculés par ce procédé avec le mélange d'émulsion de bulbe virulent et de bile rabique ont résisté ; les témoins qui ne reçoivent que du virus pur succombent dans les délais ordinaires. Ces faits confirment donc le résultat des inoculations intracrâniennes.

*
* *

Franzius prétend que la neutralisation du virus rabique par la bile des animaux morts de la rage correspond à une véritable action antitoxique, et non pas seulement à un pouvoir antiseptique de cette substance, car le mélange de bile normale de divers animaux (bœuf, porc, mouton)[1] et de virus rabique tue les lapins auxquels on l'inocule comme le virus pur lui-même. Nous ne pouvons, après nos essais de contrôle, accepter ce paragraphe des conclusions de Franzius.

Nous inoculons, dans trois séries d'expériences, à 6 lapins, dans la chambre antérieure de l'œil droit, un mélange à volumes égaux d'une fine émulsion de bulbe virulent et de bile de lapin normal, en même temps que des témoins reçoivent le virus pur. Comme lors des inoculations de virus rabique et de bile de lapin mort de la rage, nous injectons 1/4 à 1/2 c. c. du mélange.

Tous nos témoins succombent; *pas un seul des lapins qui reçoivent le virus mélangé à de la bile normale ne devient enragé.*

INOCULATIONS INTRAOCULAIRES, VIRUS RABIQUE. — BILE NORMALE
25 *février* 1899.

		CONTACT	
LAPIN N° 40	Mélange bile, lapin sain, et bulbe, rage de passage.	15 min.	Survit.
LAPIN N° 41	Mélange bile lapin sain, et bulbe, rage de passage.	3 heures.	Survit.
LAPIN N° 42	Témoin, même virus pur.		Mort le 9 mars (12 jours).

Lors d'inoculation intraoculaire, *la bile normale se comporte donc à l'égard du virus rabique absolument comme la bile des animaux morts de la rage.*

Nous avons pu, d'autre part, nous convaincre que l'inoculation sous la dure-mère du mélange de bile normale de lapin et de virus rabique ne tue pas non plus les animaux.

Tout cela nous autorise à conclure que la bile des animaux morts de la rage *n'est pas antitoxique*, mais qu'elle agit bien plutôt à la manière d'un *antiseptique*.

1. Dans cette nomenclature, Franzius ne mentionne pas le lapin.

Si la bile rabique contenait une antitoxine, celle-ci devrait, il semble, se comporter comme les autres vis-à-vis des procédés qui anéantissent le pouvoir des antitoxines.

Nous avons donc traité une assez grande quantité de bile rabique par la chaleur (110° pendant 10 minutes). Une fois refroidie, cette bile a été mélangée à son volume d'une fine émulsion de bulbe virulent. Plusieurs lapins ont été inoculés sous la dure-mère avec quelques gouttes de ce mélange : un certain nombre d'entre eux a succombé immédiatement, les animaux qui ont survécu à l'opération *ne sont pas devenus enragés*.

INOCULATIONS

1er *mars*.

LAPIN N° 50	Bile rabique, lapin et bulbe, 8e passage, volumes égaux.	Sous la dure-mère.	Survit.
LAPIN N° 51	Bile rabique chauffée, et bulbe lapin, 8e passage, vol. égaux.	Sous la dure-mère.	Survit.
LAPIN N° 52	Bile normale lapin, bulbe lapin, 8e passage, volumes égaux.	Sous la dure-mère.	Survit.
LAPIN N° 53	Témoin bulbe, 8e passage.	Sous la dure-mère.	Mort le 10 mars (9 jours).

L'inoculation intraoculaire de virus rabique et de bile rabique chauffée ne tue pas non plus le lapin. On ne peut donc admettre que la bile agit comme antitoxique : son action est purement antiseptique.

Ce qui le prouve encore, c'est que l'inoculation intraoculaire de la bile et du virus, pratiquée immédiatement après que le mélange a été effectué, tue les lapins aussi vite que le virus pur lui-même. Le *même mélange* inoculé après un *temps de contact* variable est parfaitement inoffensif ; il suffit de quelques minutes de contact pour obtenir la neutralisation du virus.

INOCULATIONS BILE RABIQUE, VIRUS, SANS CONTACT PRÉALABLE ET APRÈS CONTACT

1er *mars* 1899.

LAPIN N° 58	*In* œil, mélange volumes égaux, bile et émulsion, bulbe lapin, rage de passage.	Inoculé sans contact préalable.	Mort le 19 mars.
LAPIN N° 59	*In* œil, mélange volumes égaux, bile et émulsion, bulbe lapin, rage de passage.	Inoculé après 15 minutes.	Survit.
LAPIN N° 60	*In* œil, témoin, même virus.		Mort le 20 mars.

Enfin, nous avons constaté que l'inoculation d'un mélange *de bile normale* ou *rabique* et de *virus* est incapable de conférer l'immunité. *Aucun des 20 animaux qui ont résisté aux inoculations sous les méninges ou dans l'œil, de bile rabique, de bile rabique chauffée ou de bile normale mélangées au virus n'a survécu à l'inoculation de contrôle.* Tous sont morts dans les délais ordinaires.

CONCLUSIONS

I. La bile des lapins morts de la rage ne renferme pas d'antitoxine rabique.

II. La bile du lapin joue, à l'égard du virus rabique, le rôle d'un antiseptique très actif. En quelques minutes, une émulsion de bulbe virulent est neutralisée par un volume égal de bile.

III. L'inoculation d'un mélange, à volumes égaux, de virus rabique et de bile de lapin mort de la rage ou de bile de lapin sain ne tue pas les animaux ; elle ne leur donne pas l'immunité.

L'INOCULATION INTRA-CÉRÉBRALE
DU VIRUS RABIQUE

PAR MM.

E. LECLAINCHE, ET Ch. MOREL.

PROFESSEUR A L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE.

AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE TOULOUSE.

Au cours de recherches sur les inoculations virulentes dans le cerveau, nous avons été amenés à étudier les effets du dépôt direct du virus rabique dans l'encéphale.

L'inoculation d'une dilution de matière cérébrale en plein cerveau est parfaitement tolérée; on peut injecter ainsi, sans provoquer d'accidents, immédiats ou consécutifs, 1/4 de c. c. d'une émulsion assez épaisse chez le lapin, et 1/2 c. c. chez le chien.

Nous avons déjà décrit sommairement la technique très simple de l'opération [1]. En aucun cas, nous n'avons eu recours à l'anesthésie des sujets; mais il est indispensable que ceux-ci soient solidement fixés. Pour le lapin, la planche de Malassez assure une immobilisation parfaite. Les poils sont coupés ou rasés sur la région du crâne ; une antisepsie sommaire est suffisante en raison du peu d'importance du traumatisme opératoire. La perforation du crâne est pratiquée sur le trajet d'une ligne qui rejoindrait les commissures postérieures des paupières. à deux millimètres environ en dehors de la ligne médiane. La peau, très mince à ce niveau, est incisée sur une longueur d'un centimètre et demi, et l'on arrive directement sur le crâne. Nous nous servons pour opérer la perforation d'un petit foret à glissière, employé pour le travail du bois découpé et que l'on trouve à très bas prix dans le commerce. On adapte sur l'appareil de petites mèches mesurant 2 millimètres de largeur et pourvues d'un curseur d'arrêt, fixe ou mobile, placé à une distance de deux millimètres. L'os, peu épais, est ouvert avec la plus grande facilité et sans le moindre danger. L'aiguille de la seringue de

1. E. Leclainche et Ch. Morel. Sur les inoculations virulentes intra-cérébrales. *Société de biologie*, 7 janvier 1899.

Pravaz est enfoncée de haut en bas, en dirigeant la pointe légèrement en avant et en dehors, à une profondeur de 1 centimètre à 1 cent. 1/2. On injecte 1/8 à 1/4 de c. c. de liquide. Si on inocule plus de 1/8 de c. c., une partie de la matière inoculée reflue ordinairement par l'orifice de l'os. La plaie cutanée est fermée par deux points de suture, lavée à l'alcool, puis recouverte d'une mince nappe d'ouate et de collodion. On constate parfois, au cours de l'intervention, une crise passagère et sans gravité d'épilepsie jacksonnienne; c'est là le seul accident immédiat constaté.

Nous avons eu recours tout d'abord aux inoculations intracérébrales du virus de la rage des rues. Dans cinq cas de rage du chien, la rage est apparue sur les lapins inoculés du 14e au 17e jour; dans un cas de rage du cheval, les premiers symptômes ont été constatés le 13e jour.

Nous avons pratiqué ensuite deux séries d'inoculations, de lapin à lapin, avec du virus des rues, provenant du chien, dans le but d'étudier les modifications subies par la virulence. Une première série comprend douze passages consécutifs; une seconde n'a été entretenue que jusqu'au quatrième passage. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-joint. Des chiffres mentionnés, le premier indique le temps écoulé entre l'inoculation et l'apparition des premiers symptômes (incubation), le second fait connaître la durée totale de l'évolution.

PREMIÈRE SÉRIE			DEUXIÈME SÉRIE		
	INCUBATION	MORT APRÈS		INCUBATION	MORT APRÈS
1er passage...	15 jours	16 jours	1er passage...	14 jours	15 jours 1/2
2e — ...	16 —	16 — 1/2	2e — ...	15 —	15 — 1/2
3e — ...	15 — 1/2	16 —	3e — ...	15 —	16 —
4e — ...	12 — 1/2	13 — 1/2	4e — ...	13 —	13 — 1/2
5e — ...	8 — 1/2	9 — 1/2			
6e — ...	? 10 —	9 — 16 — 1/2			
7e — ...	9 —	9 — 1/2			
8e — ...	7 — 1/2	9 —			
9e — ...	8 —	9 —			
10e — ...	9 —	9 — 1/2			
11e — ...	7 — 11 —	[illegible] — 12 —			
12e — ...	7 —	8 —			

Dans presque tous les passages, deux lapins ont été inoculés

en même temps; presque toujours les animaux ont été pris simultanément ou à quelques heures d'intervalle seulement. Nous ne relevons que deux exceptions. L'une est relative au 6e passage de la première série: des deux lapins inoculés le 31 janvier, l'un est trouvé mort le 9 février au matin (moins de 9 jours): son compagnon est pris le 10 au matin (10 jours) et il succombe dans la nuit du 10 au 11 (10 jours 1/2). Le bulbe du premier lapin est inoculé à deux lapins qui tous deux sont pris de rage le 18 au matin (9 jours). La seconde se rapporte aux inoculés de la 11e série: alors que l'un est pris le 7e jour et meurt le 8e, l'autre reste indemne jusqu'au 11e jour et il meurt après 12 jours seulement. Le bulbe du premier lapin est inoculé à deux lapins qui sont pris ensemble le 7e jour; celui du second est inoculé à deux autres pris ensemble le 8e jour.

Les inoculations intra-cérébrales en série permettent, on le voit, de réduire rapidement la période d'incubation; après être restée stationnaire pendant trois passages, la virulence paraît s'exalter rapidement; la période d'incubation étant ramenée successivement de 16 jours à 13 jours 1/2 et à 9 jours; après quelques oscillations, elle paraît se fixer à 7 jours environ.

Il était intéressant de comparer les résultats de l'inoculation intra-cérébrale avec ceux de la pénétration du même virus dans la chambre antérieure de l'œil et dans les méninges. Cette comparaison a été faite à plusieurs reprises :

a) Les résultats comparés de quelques inoculations pratiquées dans le cerveau et dans l'œil avec un même virus sont résumés ci-après :

	Tue dans le cerveau en :	Tue dans l'œil en :
Virus des rues (2e série)	15 jours 1/2	22 jours
— 2e passage (2e série)	16 —	15 —
— 3e — (1re série)	13 — 1/2	15 —
— 4e — —	9 — 1/2	14 —
— 6e — —	9 — 1/2	12 —
— 8e — —	9 —	11 — 12 —

b) Deux fois le virus de passage est inoculé en même temps dans le cerveau et sous la dure-mère. Le virus de 2e passage (2e série), qui tue dans le cerveau en 15 jours 1/2, tue dans les méninges en 21 jours; le virus de 4e passage (2e série) qui tue dans le cerveau en 13 jours 1/2, tue sous la dure-mère en 14 jours.

Dans ces conditions, nous avons voulu constater les effets de

l'inoculation intra-cérébrale du virus *fixe*. Nous recevons de l'Institut Pasteur de Paris le cerveau, immergé dans la glycérine, d'un lapin de 527e passage, mort le 6 février; le 10 février, à 5 heures du soir, on inocule, avec une émulsion de bulbe, un lapin sous la dure-mère et un autre dans le cerveau. Le premier présente des troubles de la locomotion dans la matinée du 18 (7 jours 1/2); la paralysie est très lentement envahissante et la mort arrive seulement le 23 à 8 heures du matin (12 jours 1/2).

Le lapin inoculé dans le cerveau est pris le 21 au matin (10 jours 1/2); il est trouvé mort le 23 au matin (12 jours 1/2). Ainsi, chez les deux animaux, l'évolution, — notablement retardée, — s'est montrée tout à fait comparable [1].

La même épreuve est renouvelée avec du virus fixe frais. Deux lapins sont inoculés sous la dure-mère et deux autres dans le cerveau; tous présentent les premiers signes de la rage le septième jour; l'évolution est identique chez tous et ils succombent le dixième jour. Deux autres lapins inoculés, l'un sous la dure-mère, l'autre dans le cerveau, sont également pris ensemble le septième jour, sans que l'on constate aucune différence dans la marche de l'affection [2].

Si l'on compare les résultats de l'inoculation dans le cerveau et dans l'œil, on voit que la durée de l'incubation est notablement diminuée par le dépôt direct dans les centres. Les différences constatées varient toutefois dans des limites étendues (un à sept jours), et il semble qu'elles doivent être rapportées à la rapidité plus ou moins grande de l'absorption dans l'œil et de l'apport pour la voie nerveuse.

L'évolution de la rage reste identique que le virus soit déposé à la surface du cerveau ou dans la masse des hémisphères. Lors du dépôt sous la dure-mère, l'absorption par les méninges et l'envahissement des centres doivent s'opérer avec une extrême

1. Nous avons voulu voir si la modification se maintiendrait par un second passage. Le 24, à 9 heures du matin, on inocule un second lapin, dans le cerveau avec une dilution de bulbe. L'animal présente le 7 mars (11 jours) de la paralysie localisée au membre postérieur droit; le 8, il existe de la paralysie envahissante; le 9, la paralysie est généralisée; l'animal meurt dans la nuit du 9 au 10 (13 jours 1/2).

Ainsi la virulence a été modifiée par l'immersion dans la glycérine, peut-être en raison de la réaction ou de l'impureté du liquide.

2. Ces dernières expériences ont été réalisées sur notre demande par M. Viala, préparateur à l'Institut Pasteur de Paris; nous sommes heureux de remercier ici notre habile collaborateur.

rapidité, puisque la suppression de ce temps ne modifie pas sensiblement l'évolution. La marche des accidents n'est pas modifiée non plus par le dépôt direct du virus dans le cerveau. Parfois seulement, les troubles cérébraux apparaissent d'emblée ; l'animal est somnolent, hébété; la tête est oscillante ou appuyée par le front contre la paroi de la cage ; la paralysie atteint ensuite les membres antérieurs pour gagner d'avant en arrière. En quelques cas, ce sont les membres antérieurs qui sont atteints d'emblée. Le plus souvent, le premier symptôme consiste en de la parésie du train postérieur, suivie d'une paraplégie incomplète et d'un envahissement d'arrière en avant. La physionomie de la maladie ne diffère en rien de ce que l'on observe à la suite d'un dépôt du virus dans l'œil ou sous la dure-mère.

Ainsi, au point de vue expérimental, la méthode de l'inoculation intra-cérébrale permet d'obtenir très rapidement l'exacerbation de la virulence ; après une dizaine de passages, la période de l'incubation peut être réduite à sept jours seulement.

Le procédé est recommandable d'autre part en raison de la simplicité de la technique. L'inoculation sous la dure-mère constitue une opération délicate. L'inoculation dans l'œil n'est point d'une absolue fidélité et l'incubation se prolonge parfois au delà du trentième jour. L'inoculation intra-cérébrale nous semble constituer la méthode de choix pour les inoculations faites dans un but diagnostique.

Il est exceptionnel que les animaux d'épreuve présentent quelque accident après l'inoculation, dans le cerveau, d'une dilution de substance nerveuse fraîche, recueillie et préparée avec les précautions usuelles d'asepsie. Au cours de nos expériences, nous avons perdu trois lapins seulement ; l'un à la suite d'une hémorragie dans les méninges, les deux autres après suppuration dans le cerveau.

Les Vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur

EN 1898

PAR LE D[r] HENRI POTTEVIN.

I

Pendant l'année 1898, 1,465 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur : 4 sont mortes de la rage ; chez l'une d'elles, la mort est survenue 10 jours après la fin du traitement[1]. Deux personnes ont été prises de rage au cours du traitement, elles ne sont pas comptées parmi les traitées.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées..................	1,465
Morts..............................	3
Mortalité 0/0......................	0,20

Dans le tableau suivant, ces chiffres sont rapprochés de ceux fournis par les statistiques des années précédentes.

Années.	Personnes traitées.	Morts.	Mortalité 0/0.
—	—	—	—
1886...............	2671	25	0,94
1887...............	1770	14	0,79
1888...............	1622	9	0,55
1889...............	1830	7	0,38
1890...............	1540	5	0,32
1891...............	1559	4	0,25
1892...............	1790	4	0,22
1893...............	1648	6	0,36
1894...............	1387	7	0,50
1895...............	1520	5	0,33
1896...............	1308	4	0,30
1897...............	1521	6	0,39
1898...............	1465	3	0,20

1. D'après les expériences faites sur les chiens, on est autorisé à penser que les centres nerveux des personnes mortes de rage dans les 15 jours qui suivent le traitement ont été envahis par le virus rabique avant que cure ait pu avoir toute son efficacité.

II

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Tableau C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition, entre ces catégories, des personnes traitées en 1898.

	MORSURES A LA TÊTE			MORSURES AUX MAINS			MORSURES AUX MEMBRES			TOTAUX		
	Traités.	Morts.	Mortalité.	Traités.	Morts.	Mortalité.	Traités.	Morts.	Mortalité.	Traités.	Morts.	Mortalité.
Tableau A.	11	0	0	100	0	0	30	0	0	141	0	0
Tableau B.	80	0	0	549	1	0.18	226	0	0	855	1	0,11
Tableau C.	41	0	0	265	1	0,37	163	1	0,61	469	2	0,42
	132	0	0	914		0.22	419	1	0,24	1465	3	0,20

III

Au point de vue de leur nationalité, les 1,465 personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Angleterre	25	Hollande	1
Belgique	21	Indes anglaises	56
Egypte	2	Siam	1
Espagne	1	Suisse	21
Grèce	3	Turquie	1

Soit 132 étrangers et 1,353 français.

Voici la répartition par départements des 1,353 Français :

Ain	40	Ardèche	2
Aisne	0	Ardennes	0
Allier	4	Ariège	0
Alpes (Basses-)	0	Aube	0
Alpes (Hautes-)	0	Aude	0
Alpes (Maritimes)	0	Aveyron	13
Alger	0	Bouches-du-Rhône	0

Calvados	4	Marne (Haute-)	0
Cantal	24	Mayenne	2
Charente	15	Meurthe-et-Moselle	3
Charente-Inférieure	9	Meuse	1
Cher	4	Morbihan	7
Constantine	0	Nièvre	4
Corrèze	15	Nord	1
Corse	0	Oise	7
Côte-d'Or	0	Oran	1
Côtes-du-Nord	10	Orne	6
Creuse	1	Pas-de-Calais	1
Dordogne	44	Puy-de-Dôme	13
Doubs	0	Pyrénées (Basses-)	18
Drôme	0	Pyrénées (Hautes-)	20
Eure	4	Pyrénées-Orientales	0
Eure-et-Loir	7	Rhin (Haut-)	1
Finistère	15	Rhône	113
Gard	0	Saône (Haute-)	2
Garonne (Haute-)	30	Saône-et-Loire	2
Gers	16	Sarthe	3
Gironde	26	Savoie	9
Hérault	1	Savoie (Haute-)	12
Ille-et-Vilaine	9	Seine	502
Indre	0	Seine-et-Marne	9
Indre-et-Loire	6	Seine-et-Oise	63
Isère	36	Seine-Inférieure	12
Jura	2	Sèvres (Deux-)	4
Landes	15	Somme	3
Loir-et-Cher	1	Tarn	24
Loire	42	Tarn-et-Garonne	18
Loire (Haute-)	7	Var	0
Loire-Inférieure	8	Vaucluse	0
Loiret	1	Vendée	4
Lot	18	Vienne	9
Lot-et-Garonne	37	Vienne (Haute-)	1
Lozère	0	Vosges	1
Maine-et-Loire	4	Yonne	0
Manche	5	Madagascar	1
Marne	1		

PERSONNES TRAITÉES, MORTES DE LA RAGE

Hursaint Louis, 39 ans, agent de police à Saint-Germain (Seine-et-Oise), mordu le 19 mars au poignet droit par un chien errant qui, abattu aussitôt, fut déclaré enragé après autopsie par M. Simonnet, médecin-vétérinaire à Saint-Germain. Les blessures, au nombre de trois, étaient profondes et n'avaient pas été cautérisées.

Hursaint a été traité à l'Institut Pasteur du 20 mars au 6 avril : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 7 mai ; il est mort le 10 mai.

Hesteau Henri, 68 ans, tourneur à la Rochelle, mordu le 24 avril à la face dorsale de la main droite par un chien que M. Besnard, médecin-vétérinaire à la Rochelle, avait déclaré « fortement suspect de rage ».

La morsure n'avait pas été cautérisée, le traitement antirabique a été appliqué du 27 avril au 14 mai; les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 2 septembre, la mort est survenue le 4 septembre.

Le docteur Boutiron, médecin à Saint-Xandre (Charente-Inférieure), qui a soigné Hesteau, pense que la cause déterminante immédiate de l'éclosion de la rage a dû être un surmenage physique, le malade ayant fait quelques jours avant « des marches très exagérées pour son âge et sa constitution ».

O'Leary Albert, 22 ans, employé au département des travaux militaires à Lahore (Indes anglaises), mordu le 22 août à la face antéro-externe de la cuisse droite, par un chien errant qui ne put être retrouvé. Les morsures, au nombre de trois, avaient été faites au travers d'un pantalon qu'elles avaient déchiré; elles avaient été cautérisées au nitrate d'argent au bout de 40 minutes.

O'Leary a été traité à l'Institut Pasteur du 12 septembre au 26 octobre, il est mort de la rage à Mian-Mir (Indes anglaises) le 22 novembre; son cas a donné lieu à certaines polémiques. Un journal anglais des Indes, *The Englishman*, a publié une dépêche d'après laquelle le chien qui avait mordu O'Leary serait encore vivant et en parfaite santé; ce fait nous a été signalé par un rapport de M. le consul général de France à Calcutta, que M. le ministre des Affaires étrangères a bien voulu nous communiquer; nous avons procédé à une enquête, et nous donnons ci-dessous un extrait d'une lettre qui nous a été adressée des Indes le 20 avril dernier par le frère de O'Leary; il met les choses au point : « Vous me demandez des renseignements sur le chien qui a mordu mon frère, on n'a pas retrouvé sa trace et aucun vétérinaire n'a pu l'examiner; à part mon pauvre frère, personne n'a vu ce chien, on n'a donc aucune preuve qu'il fût malade; mais en même temps que mon frère, il a mordu un petit chien à nous, celui-ci était encore vivant quand mon frère est mort, depuis on l'a abattu. »

PERSONNES PRISES DE RAGE AU COURS DU TRAITEMENT

Lerang, Jean-Marie, 48 ans, chanteur ambulant, mordu le 27 janvier à Villefranche (Rhône), par un chien que M. Raymond, médecin-vétérinaire à Villefranche, avait déclaré enragé après autopsie : les morsures, au nombre de treize, étaient situées sur le nez, huit

sur la face dorsale de la main droite, quatre sur la face dorsale de la main gauche; elles n'avaient pas été cautérisées.

Lerang a été traité à l'Institut Pasteur à partir du 4 février, son traitement devait durer 21 jours. Le 20 février, il se plaint de n'avoir pas d'appétit, de ne pas dormir: le 21, il éprouve de violentes douleurs dans la tête et le thorax, et les symptômes caractéristiques de la rage se manifestent (aérophobie, spasmes typiques) ; il est mort à l'hôpital Necker le 22 février.

Trois autres personnes mordues par le même chien et traitées à l'Institut Pasteur sont actuellement en parfaite santé.

Mac-Quillan, Terance, 3 ans, de Castel-Blarney (Irlande), mordu le 10 août par un chien que la mère de l'enfant nous déclare avoir été reconnu enragé par un vétérinaire.

Une première morsure longue de 8 centimètres environ s'étend depuis la partie médiane du front jusqu'au-dessus de l'oreille gauche, les bords sont réunis par six points de suture. Quand l'enfant se présente à l'Institut Pasteur, le 14 août, elle est en mauvais état.

Une deuxième morsure très pénétrante est située au-dessous de l'os malaire gauche.

Ces blessures avaient été cautérisées au bout de 1/2 heure avec un caustique?

Le jeune Mac-Quillan a été traité à l'Institut Pasteur à partir du 14 août, son traitement devait durer 21 jours; le 29 août, il manifesta des symptômes rabiques, il mourut à l'hôpital des Enfants-Malades le 31 août.

MALADE PRIS DE RAGE MOINS DE QUINZE JOURS APRÈS LA FIN DU TRAITEMENT

Mac-Quillan, John, 7 ans, de Castel-Blarney (Irlande), mordu le 10 août par le même chien que son frère (voir plus haut).

Le détail des morsures était .

1° Au-dessus de l'arcade sourcilière droite, une morsure linéaire, longue de deux cent.; les bords sont retenus par deux points de suture;

2° Joue droite, au-dessous de l'os malaire, une morsure pénétrante;

3° Sur la périphérie du 1/3 inférieur de l'avant-bras droit, trois morsures très pénétrantes, faites sur le membre nu;

4° Sur les troisièmes phalanges des quatre derniers doigts de la main droite, cinq morsures pénétrantes.

Toutes ces blessures avaient été cautérisées au bout de 1/2 heure avec un caustique? Quand l'enfant arriva à l'Institut Pasteur, elles étaient en mauvais état.

Le traitement antirabique a été appliqué du 14 août au 3 septembre, l'enfant est mort de la rage le 13 septembre.

SUR L'AMYLASE

Par M. YVON [1]

Les procédés de préparation industrielle de l'amylase destinée aux usages thérapeutiques, les plus employés aujourd'hui, sont celui de Lintner et celui du Codex; ils reposent sur les mêmes principes et ne diffèrent que par les détails de manipulation. La pharmacopée française fait broyer au moulin de l'orge germé desséché à 50°; on le laisse en contact pendant 5 ou 6 heures avec 2 parties d'eau froide en agitant de temps en temps; on passe avec expression, on filtre, et on ajoute à la liqueur 2 fois son volume d'alcool à 95 centièmes. Le précipité est recueilli sur un filtre, étalé en couches minces sur des lames de verre, puis desséché rapidement dans un courant d'air à une température qui ne doit pas dépasser 45 degrés.

Lintner conseille d'employer le malt vert, finement moulu : on le laisse en contact pendant 24 heures avec 2 à 4 fois son poids d'alcool à 20 centièmes, puis, après filtration, on mélange le liquide avec 2 fois à 2 fois 1/2 son volume d'alcool absolu. Le précipité d'amylase est lavé d'abord avec de l'alcool absolu, puis avec de l'éther, et, finalement, desséché dans le vide.

Chacun de ces procédés présente des avantages et des inconvénients. Celui du Codex est plus simple en ce sens qu'il ne nécessite ni l'emploi du vide ni lavage à l'alcool absolu et à l'éther. Le rendement en amylase est assez élevé, comme nous le verrons plus loin; mais le pouvoir diastasique est plus faible que celui de l'amylase obtenue par le procédé de Lintner. En effet, l'amylase en solution aqueuse s'altère assez rapidement, de là l'obligation de ne pas prolonger la macération plus de 5 ou 6 heures; d'autre part, l'eau pure ne dissout pas seulement l'amylase, mais en outre une notable proportion des autres matières solubles qui existent dans le malt : le soluté est un peu visqueux, et pratiquement la filtration au papier n'est pas possible. Comme il faut opérer rapidement, on passe sur un linge

1. Ce travail a été fait au laboratoire de M. Duclaux, à l'Institut Pasteur.

fin : le liquide recueilli est alors plus ou moins trouble et tient en suspension des grains de matière amylacée. Lors du traitement par l'alcool, cet amidon se précipite en même temps que les autres matières extractives et l'amylase. Toutes ces matières étrangères divisent le précipité et permettent de le dessécher assez rapidement dans un courant d'air, mais en même temps qu'elles accroissent le rendement, elles diminuent l'activité proportionnelle du ferment.

Dans le procédé de Lintner, la présence de l'alcool empêche en assez grande partie la solution des principes extractifs autres que l'amylase, et prévient en même temps l'altération trop rapide de ce ferment : on peut donc prolonger la macération pendant 24 heures; le liquide filtre plus facilement, et il est facile de l'obtenir limpide et privé de grains d'amidon : l'amylase précipitée par l'alcool sera donc mélangée d'une proportion moindre de matières étrangères; le lavage à l'alcool, puis à l'éther la déshydratent, et l'action du vide permet de la dessécher rapidement, condition indispensable pour obtenir un produit actif. Le procédé de Lintner fournit une amylase très active; mais le rendement est assez faible; enfin l'emploi du vide ne le rend pas applicable dans tous les laboratoires.

Ces considérations m'ont conduit à emprunter à chaque procédé ce qu'il présentait d'avantageux, et à adopter un mode de préparation qui permet d'obtenir facilement un produit actif et avec un rendement très satisfaisant. Le pouvoir diastasique de l'amylase sera d'autant plus élevé qu'elle sera restée moins longtemps en solution aqueuse, que son contact avec l'alcool très concentré sera plus court, et que la dessiccation aura été plus rapide. Voici comment j'ai concilié toutes ces conditions :

J'ai fait choix du malt touraillé que l'on peut se procurer en tout temps. Depuis que la fabrication des bières blondes se fait sur une vaste échelle, le malt qui sert à leur préparation est touraillé à une température assez basse, l'amylase n'est altérée qu'en faible proportion, et le rendement est très satisfaisant.

D'autre part, le liquide hydro-alcoolique provenant du malt touraillé filtre bien plus facilement que celui obtenu avec le malt vert. J'ai réduit au minimum la quantité de liquide employé pour épuiser la poudre de malt, de manière à diminuer dans les mêmes proportions celle de l'alcool employé pour la précipita-

tion. Au lieu d'alcool absolu, j'emploie l'alcool à 97 centièmes, que les appareils distillatoires actuels permettent d'obtenir facilement du premier jet.

Voici le mode opératoire que j'ai adopté :

250 grammes de malt touraillé finement moulu sont placés dans un bocal que l'on peut boucher, et mélangés avec 2 fois leur poids, soit 500 grammes d'alcool à 20 centièmes. On laisse macérer pendant 24 heures en agitant fréquemment : on jette alors le mélange sur un filtre et l'on essore à la trompe ; si l'opération est bien conduite[1], on recueille environ 75 0/0, soit 375 grammes de liquide ; on verse alors sur le malt de l'alcool à 20 centièmes et l'on continue à faire fonctionner la trompe jusqu'à ce que l'on ait recueilli une quantité suffisante de liquide (environ 125 grammes) pour compléter les 500 grammes. En opérant de cette manière on obtient la presque totalité de l'amylase dissoute, et le soluté est *absolument limpide*.

On le place dans un flacon d'une capacité d'environ 2 litres dans lequel on verse de l'alcool à 97 centièmes de manière à précipiter l'amylase. La quantité d'alcool que l'on doit employer varie de 2 fois à 2 fois et demi le volume de la solution diastasique, soit dans le cas présent de 1 litre à 1 litre 1/4. Il est impossible de fixer exactement la proportion ; il faut, en effet, et c'est là le *tour de main* indispensable, que l'alcool soit ajouté en quantité suffisante pour que l'amylase précipitée se rassemble rapidement (5 à 6 minutes au plus) au fond du flacon où elle forme une couche assez dense. On décante alors le liquide avec un siphon percé d'une ouverture *latérale*, et l'on ne doit pas conserver beaucoup plus de 100 c. c. du mélange tenant en suspension l'amylase précipitée.

On transvase alors dans un petit flacon à large ouverture, on ajoute la moitié du volume, soit environ 50 c. c. d'éther sulfurique $D = 0,722$, et l'on mélange en renversant plusieurs fois le flacon sans agiter. Le précipité d'amylase se rétracte instantanément et tombe au fond du flacon, on peut décanter la presque totalité du mélange éthéro-alcoolique ; on jette alors le précipité d'amylase sur un linge fin, on exprime par torsion et l'on fait dessécher dans une étuve chauffée à

1. Pour cette opération, on se sert avec avantage d'entonnoirs cylindriques en porcelaine spécialement fabriqués pour ce genre d'opération.

38 degrés. La préparation de l'amylase, depuis le moment où l'on ajoute l'alcool au macéré de malt jusqu'à celui où l'on porte à l'étuve le précipité, ne doit pas exiger plus de 20 à 25 minutes.

On obtient ainsi de 13.4 à 17,60 pour 1.000, soit en moyenne 15,5 0/00 d'une matière blanche, dont la surface seule jaunit pendant la dessiccation : elle est très soluble dans l'eau froide, et renferme de 7,40 à 7,52 millièmes de cendres.

En suivant le procédé du Codex, et en filtrant le macéré aqueux sur un linge fin, le rendement en amylase s'élève à 27/1000 en moyenne, la proportion de cendres est de 8/1000 : ce chiffre est sensiblement égal à celui indiqué plus haut ; les impuretés sont en effet de nature organique.

J'ai comparé l'énergie diastasique de l'amylase obtenue par ces deux procéés. J'ai fait choix de la fécule de pomme de terre : pour obtenir des résultats aussi comparables que possible entre eux, il faut non seulement opérer avec la même fécule, mais encore la laver et la dessécher avec précaution. Pour cela on laisse la fécule du commerce en contact pendant 24 heures avec 4 fois son poids d'alcool à 20 centièmes, en agitant de temps en temps ; on décante et on lave la fécule avec de l'eau distillée bien pure, jusqu'à ce que cette eau passe incolore, n'exerce plus de réaction sur le papier de tournesol et ne laisse plus de résidus à l'évaporation. On essore à la trompe et l'on fait déssécher dans une étuve dont la température ne doit pas dépasser 38 degrés. Dans ces conditions, la fécule retient 8,656/100 d'eau.

Avec de la fécule ainsi *lavée et desséchée* et de l'*eau distillée* [1], j'ai préparé de l'empois à 5/100, et sur cet empois j'ai fait agir pendant *une heure* l'amylase à une température fixe de 60 degrés. Cette température est sensiblement celle à laquelle l'amylase présente son maximum d'activité. Dans ces conditions, l'opération n'exige pas un temps aussi considérable que celui fixé par le Codex et la quantité de maltose produite est cependant élevée.

Les résultats de nombreux essais sont réunis dans le tableau suivant : les chiffres donnés se rapportent à la fécule supposée *entièrement privée d'eau.*

Si on voulait faire une comparaison exacte des activités de l'amylase fournie par les deux méthodes, il faudrait, comme l'a

1. L'eau distillée ne doit exercer aucune action sur le papier de tournesol ou sur la phtaléïne de phénol.

L'AMYLASE AGIT PENDANT 1 HEURE SUR LA FÉCULE LAVÉE (EMPOIS A 5 0/0) A LA TEMPÉRATURE DE 60°. — LIQUEUR DE FEHLING NORMALE ÉTENDUE DE 2 FOIS SON VOLUME D'EAU. — POUVOIR RÉDUCTEUR DE LA MALTOSE 63 0/0

SÉRIE	FÉCULE		EAU	AMYLASE EN CENTIGRAMMES	RAPPORT DE L'AMYLASE A LA FÉCULE	Proportion pour 100 de fécule sèche saccharifiée.				L'Amylase saccharifie X fois son poids de fécule sèche.				VOLUME de Liqueur de Fehling DÉCOLORÉE	
						PROCÉDÉ DU CODEX		PROCÉDÉ PROPOSÉ		PROCÉDÉ DU CODEX		PROCÉDÉ PROPOSÉ			
	Séchée à 28.	Séchée à 105.				Pour la totalité de l'amylase.	Pour 1 centigr. d'amylase.	Pour la totalité de l'amylase.	Pour 1 centigr. d'amylase.	Pour la totalité de l'amylase.	Pour 1 centigr. d'amylase.	Pour la totalité de l'amylase.	Pour 1 centigr. d'amylase.	Procédé du Codex.	Procédé proposé.
	gr.	gr.	c. c.												
5	5	4,567	100	5	1/100	70,64	14,13	76,53	15,23	322,6	64,5	349,5	69,9	4,29	4,65
4	5	4,567	100	4	1/125	70,64	17,56	76,53	19,03	322,6	80,6	349,5	87,37	4,29	[illegible]
3	5	4,567	100	3	1/166	70,64	23,55	73,44	24,81	322,6	107,5	335,4	111,8	4,29	4,46
2	5	4,567	100	2	1/250	68,30	34,15	72,25	36,13	310,6	155,3	330	165	4,13	4,37
1	5	4,567	100	1	1/500	49,26		70,65		225		322,6		3,10	4,29
10	10	9,134	200	1	1/1000	32,22		68,02		294,3		621		1,95	4,16
15	15	13,702	300	1	1/1500	25,7		62,94		352,5		863		1,40	3,84
20	20	18,269	400	1	1/2000	22,7		49,64		414,25		907		1,20	3,03
25	25	22,836	500	1	1/2500	14,24		25,87		323		616,8		0,82	[illegible]

montré M. Duclaux dans sa microbiologie (t. II), soit comparer les temps nécessaires pour arriver à la même proportion d'amidon saccharifié dans les deux expériences comparatives, soit comparer les quantités de sucre produit dans le même temps au début de l'action, avant que la quantité d'amidon saccharifié ait atteint 8 à 10 0/0 de la quantité totale. On peut se contenter d'une comparaison entre 2 chiffres du tableau convenablement choisis. Ils ne doivent ni correspondre au début de l'action, au moment où elle est très rapide, ni à la fin, au moment où elle est près de se terminer. Les meilleurs, à ce point de vue, sont les nombres de 49, 26 0/0 correspondant à l'amylase du Codex agissant sur 500 fois son poids de fécule, et celui de 49, 64 0/0 fourni par l'amylase de mon procédé agissant sur 2,000 fois son poids de fécule. Le rapport est de 4 à 1. La méthode que je propose fournit donc une amylase environ 4 fois plus active que la méthode du Codex.

La pharmacopée française dit que l'amylase officinale doit transformer en sucre réducteur 50 fois seulement son poids de fécule ou d'amidon, ce que l'on vérifie par l'essai suivant :

10 *centigrammes* d'amylase sont dissous dans 100 grammes d'empois renfermant 6 grammes de fécule ou d'amidon : on chauffe à 50 degrés au bain-marie pendant six heures; on doit alors obtenir un liquide fluide, filtrant facilement, et décolorant *cinq* fois son volume de liqueur de Fehling *normale*.

L'activité exigée est manifestement trop minime, et le mode d'essai très critiquable. Il paraît préférable de faire agir l'amylase à la température sensiblement *optimale*, de réduire la durée de l'action et d'adopter le *modus operandi* suivant :

Faire agir *un* centigramme d'amylase sur 100 grammes d'empois renfermant 5 grammes de fécule préalablement lavée et desséchée à 38°. Cet empois doit être préparé avec de l'eau distillée bien *neutre*. Le mélange sera maintenu pendant 1 heure au bain-marie chauffé à 60 degrés : au bout de ce temps on doit obtenir un liquide limpide, filtrant facilement et capable de décolorer à l'ébullition 4 fois son volume de liqueur de Fehling normale. Dans ces conditions, l'amylase transformerait en maltose environ 300 fois son poids de fécule.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

13me ANNÉE JUILLET 1899 No 7

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA SPIRILLOSE DES OIES

Par le Dr J. CANTACUZÈNE

(Travail du laboratoire de M. E. Metchnikoff.)

I

INTRODUCTION

Nous connaissons aujourd'hui deux maladies dues à la pullulation, dans le sang, de microorganismes appartenant au groupe des spirilles. L'une est la fièvre récurrente dont l'agent pathogène est un spirille découvert par Obermeier en 1868; l'autre est une septicémie atteignant les oies, étudiée pour la première fois en 1890 par M. Sacharoff. Dans l'une et l'autre de ces maladies, on observe ce fait caractéristique que les spirilles, après s'être multipliés dans des proportions vraiment colossales, se mettent à décroître en nombre et finissent par disparaître du sang; souvent un petit nombre d'heures suffit pour que cette disparition soit complète. Dans la fièvre récurrente, cette disparition des spirilles s'effectue plus rapidement et coïncide avec une brusque chute de la température du corps; au contraire, dans la spirillose des oies, la défervescence se fait d'une manière plus lente, plus progressive, en « lysis », et son début précède souvent de 1-2 jours le moment où les spirilles disparaissent du sang.

Comment expliquer ce brusque départ des spirilles intravasculaires? Que deviennent-ils? Sont-ils détruits sur place? Et par

quel mécanisme? Ce problème a déjà donné lieu à toute une série de recherches systématiques. Les plus importantes, en ce qui concerne la fièvre récurrente, sont, dans l'ordre chronologique, celles de M. Metchnikoff, de M. Soudakewitch et de M. Gabritchewsky.

Les recherches faites par M. Metchnikoff sur des singes ont démontré que, au moment de la crise, les spirilles sont détruits en masse dans la rate, à l'intérieur des leucocytes polynucléaires; ils sont englobés vivants; jamais on n'observe de destruction extra-cellulaire des spirilles dans les humeurs de l'organisme. Jamais, en outre, on ne constate leur englobement par les phagocytes du foie ou de la moelle des os, grands mangeurs de particules inertes. Ce dernier fait va contre l'hypothèse d'une action immobilisante ou atténuante des liquides organiques. Enfin, les spirilles conservent, dans le sang, leur mobilité jusqu'au moment de leur complète disparition.

Les intéressantes recherches de Soudakewitch sur des singes dératés sont venues confirmer cette façon de voir; après avoir constaté que, chez les témoins non dératés, la disparition des spirilles et leur destruction s'effectuaient exactement de la manière décrite par M. Metchnikoff, ce savant vit que le processus est tout différent chez les animaux privés de leur rate; dans ce cas, en effet, la crise n'a pas lieu; le nombre des spirilles va croissant d'une façon continue dans le sang, et l'animal meurt en pleine infection; les spirilles sont, à ce moment, si nombreux que les vaisseaux de moyen calibre se trouvent obturés par de véritables bouchons spirillaires; la moelle des os, les endothelia hépatiques restent complètement inactifs; la pullulation des spirilles et leur extrême mobilité montrent bien qu'ils ne subissent dans ce cas, de la part des humeurs, aucune action bactéricide, et cependant une petite rate supplémentaire rencontrée chez l'un des animaux s'est trouvée gorgée de spirilles contenus à l'intérieur des leucocytes polynucléaires. La fonction défensive de la rate se trouve ainsi bien mise en lumière.

Cet ensemble d'observations ne suffit cependant pas pour convaincre M. Gabritchewsky qui, tout en reconnaissant aux phagocytes un certain rôle dans la destruction des spirilles de la fièvre récurrente, considère cependant la doctrine phagocytaire comme incapable d'expliquer d'une manière satisfaisante la

disparition si brusque des spirilles du sang. Cette explication, il croit la trouver dans le fait de l'apparition, au moment de la crise, de substances bactéricides dans le sang; ces substances causeraient ainsi la mort d'un grand nombre de spirilles contenus dans les vaisseaux; les phagocytes ne feraient qu'achever leur destruction, jouant en quelque sorte le rôle de fossoyeurs. L'expérience fondamentale, sur laquelle M. Gabritchewsky base son hypothèse, est la suivante : si, à une goutte de sang contenant des spirilles bien mobiles, on mélange une goutte de sérum humain normal, on voit les microbes vivre à l'aise pendant 160 heures dans le mélange; si, au contraire, à la goutte contenant les spirilles, on ajoute une goutte de sérum provenant d'un sang critique, on voit les spirilles du mélange périr en 1/2 heure à 37°, en 2-4 h. à la température du laboratoire.

On peut de la sorte constater que le sang des malades devient d'autant plus bactéricide qu'ils approchent davantage de la crise. Nous n'insisterons pas ici sur les expériences de M. Gabritchewsky; nous y reviendrons plus tard à propos de la spirillose des oies. Nous ferons seulement observer d'une façon générale que, de ces observations faites dans des conditions tout à fait artificielles, il est impossible de tirer une conclusion relativement aux processus qui ont lieu dans l'organisme. L'étude d'un grand nombre d'infections expérimentales nous a appris d'une façon certaine que les phénomènes observés *in vitro* ne correspondent nullement à ceux qui se passent dans l'organisme. D'autre part, si M. Mamourowsky et M. Gabritchewsky lui-même ont vu des spirilles dégénérés en forme de chapelets dans le sang de malades en train de faire leur crise, formes qui n'ont été constatées *in vivo* ni par M. Metchnikoff ni par M. Soudakewitch, il y a tout lieu de croire qu'il s'agit là de formations artificielles, dues à quelque accident de préparation. Il suffit, en effet, lors du passage à la flamme, de chauffer trop fortement un point quelconque de la préparation, pour retrouver en ce point, et en ce point seul, les spirilles moniliformes de Mamourowsky; dans ce cas, la chaleur détruit par endroits le corps cellulaire, et le spirille ne prend plus la couleur que de place en place, d'où l'impression d'une chaînette de points colorés. Il est aisé d'obtenir, par le même moyen, des apparences analogues, avec les vibrions cholériques.

M. Gabritchewsky, pour expliquer la réapparition, dans le sang, des spirilles, au moment du 2e accès, malgré l'état bactéricide des humeurs, a supposé que, dans l'intervalle des accès, quelques spirilles persistent sous forme de spores. C'est là une pure hypothèse que nulle observation directe ne confirme. A propos de la spirillose des oies, il émet également l'hypothèse que les formes végétatives elles-mêmes persistent, après la crise, dans la pulpe des organes internes. Or, chez les oies, les organes internes sont aussi dépourvus de spirilles, la crise terminée, que le sang lui-même. On ne retrouve pendant quelque temps encore de microorganismes vivants que dans la rate et la moelle des os, qui sont précisément les lieux de leur destruction en masse à l'intérieur des phagocytes, ainsi que nous le verrons plus loin.

Dans le but de résoudre le problème de la destruction des spirilles, M. Gabritchewsky a entrepris une nouvelle série d'études [1]; mais cette fois il s'est adressé non à la fièvre récurrente de l'homme, mais à la spirillose des oies. Nous résumons ici en peu de mots la partie de son travail qui concerne la destruction des spirilles chez les oies non immunisées ou ne possédant pas l'immunité naturelle.

Des observations répétées, très minutieuses, ont permis à M. Gabritchewsky de se convaincre que, dans le sang retiré à une oie en pleine infection, la survie des spirilles est d'autant plus courte que la saignée a eu lieu à un moment plus voisin de la crise : cela aussi bien dans les préparations conservées à 37° que dans celles conservées à la température du laboratoire (16°); mais la mort des spirilles se fait toujours plus vite à 37° qu'à 16°. Dans le sang retiré pendant les deux premiers jours de l'infection, les spirilles périssent au bout de 48-60 heures à 37°, de 120-192 heures à 16°; la survie est deux fois plus courte au 3e et au 4e jour. Dans le sang retiré immédiatement avant la disparition complète des spirilles, ceux-ci périssent au bout de quelques minutes; ils s'immobilisent et se désagrègent sous les yeux de l'observateur; on les voit, dans ce cas, s'agglomérer sous forme de gros pelotons enchevêtrés dans lesquels se manifestent aussitôt d'énergiques phénomènes de bactériolyse; en peu d'instants tous les microorganismes sont

1. *Centralblatt f. Bact.* XXIII, nos 9, 10, 11, 15, 17, 18, 1898.

réduits en fines granulations. Comme l'on trouve à ce moment dans les préparations un grand nombre de leucocytes dégénérés, on pourrait rattacher à cette phagolyse l'origine de la substance bactéricide. De semblables pelotons commencent à apparaître dans le sang en circulation vers la fin du 4e jour; avant ce moment, le sang circulant présente fréquemment des spirilles agglutinés sous forme de mèches ou de faisceaux ; il s'agit en effet là de véritables processus agglutinatifs. Chez les oies qui ont résisté à la maladie, le sang conserve encore des propriétés bactéricides très marquées ; au contraire, les propriétés bactériolytiques disparaissent rapidement.

Les expériences précédentes ne permettent pas, selon M. Gabritchewsky, de douter de la formation, dans le sang, de substances bactéricides. Comment ces substances sont-elles réparties dans l'organisme ? Les divers appareils en sont-ils également saturés ?

Si à du sang contenant des spirilles bien mobiles on ajoute d'une part du sérum critique, de l'autre une émulsion de pulpe de rate, de moelle des os, etc., recueillie au moment de la crise, on voit les spirilles périr en 5-15 minutes dans le sérum, survivre au contraire 3-9 heures au contact de l'émulsion de rate, 3-7 heures en présence des cellules de la moelle. De plus le sang est inégalement bactéricide dans les différents points du territoire vasculaire : le pouvoir bactéricide est, par exemple, infiniment plus prononcé dans le sang du cœur que dans le sang recueilli au sortir de la rate. Le sang représente donc le milieu bactéricide où s'opère la destruction des spirilles ; et c'est précisément parce que la rate représente un milieu dont le pouvoir bactéricide est relativement faible, que l'on voit les spirilles y séjourner encore longtemps après leur disparition du sang.

Ces phénomènes observés *in vitro* permettent-ils de conclure à des processus analogues dans l'organisme ? Sans nul doute, dit M. Gabritchewsky, surtout si l'on tient compte du caractère spécifique des substances bactéricides, et aussi du fait que les oscillations du pouvoir bactéricide suivent exactement les diverses phases de la maladie. D'ailleurs, dès l'instant que l'on attribue à la phagolyse les phénomènes bactéricides observés *in vitro*, pourquoi ne pas raisonner de même relativement à la destruction des spirilles dans l'organisme ? Ne sait-on pas en effet

qu'un grand nombre de leucocytes périssent constamment dans le sang? La leucocytose du sang qui accompagne l'infection spirillienne est un fait constant, plus précoce seulement chez des oies protégées par le sérum immunisant. L'état bactéricide du sang est une conséquence de cette leucocytose critique; sous l'action de la substance bactéricide les spirilles s'agglutinent, puis se désagrègent; l'activité phagocytaire n'apparaît que comme un adjuvant de ces processus extracellulaires.

Telles sont les conclusions d'une partie, tout au moins, du travail de M. Gabritchewsky.

Sur les conseils de mon maître, M. Metchnikoff, j'ai repris en détail l'étude des processus anatomo-pathologiques qui accompagnent la pullulation des spirilles dans l'organisme des oies et leur disparition; j'ai constamment tâché de mettre en regard les phénomènes observés *in vitro* et ceux observés dans le sang circulant ou dans les organes.

Les spirilles qui ont servi à nos expériences ont été obligeamment fournis par M. Gabritchewsky à M. Roux, qui a bien voulu les mettre à notre disposition. Nous l'en remercions sincèrement.

Je rappelle ici, d'après Sacharoff et Gabritchewsky, que les oiseaux sensibles à l'infection spirillienne sont l'oie et le canard; les poules succombent rarement; le pigeon et le moineau sont réfractaires, ainsi que tous les autres animaux de laboratoire. J'ajouterai que si la poule adulte est presque réfractaire à la maladie, les très jeunes poussins y sont au contraire extraordinairement sensibles.

Une semblable étude nécessitait la recherche d'une bonne technique pour la coloration des spirilles dans les coupes. Cette coloration est en effet d'une difficulté extrême; elle est infiniment plus laborieuse que celle des spirilles d'Obermeier, et cela d'abord parce que le spirille de Sacharoff se décolore beaucoup plus facilement; en outre, n'étant jamais englobé par les leucocytes polynucléaires, mais bien par les mononucléaires dont le protoplasma est basophile, il est très difficile de le différencier à l'intérieur des phagocytes.

La méthode qui a donné à Nikiforoff de bons résultats pour la coloration des spirilles d'Obermeier a échoué entre nos mains dans la spirillose des oies. Et d'abord signalons l'impor-

tance du liquide fixateur; les organes fixés par le sublimé, l'acide chromique, l'acide picrique, l'acide nitrique (réactif d'Altmann) ou l'alcool n'ont donné que des colorations défectueuses: seuls les liquides contenant de l'acide osmique nous ont fourni des fixations permettant de déceler les spirilles englobés par les phagocytes. Voici, parmi les nombreuses méthodes essayées, celle qui nous a fourni les meilleurs résultats :

1° Fixer les organes (débités en fragments très petits) par le liquide de Flemming faible; laisser 24 heures dans le liquide fixateur;

2° Laver à l'eau pendant 24 heures;

3° Série des alcools, xylol, inclusion à la paraffine;

4° Colorer les coupes collées sur lame avec le liquide suivant :

Solution fuchsinée de Ziehl	2 parties.
Glycérine neutre	1 partie.

Les coupes doivent être très minces et ne pas dépasser 3-4 μ d'épaisseur. Il faut laisser 24 heures en contact avec le bain colorant. On peut, dans la solution de Ziehl, remplacer la fuchsine par le rouge de Magenta;

5° Laver à l'eau rapidement; enlever l'excès d'eau au papier buvard, puis plonger la préparation dans une série de bains d'éther pour éviter la déshydratation par l'alcool (il faut employer de l'éther aussi anhydre que possible). L'immersion totale dans l'éther dure 4-6 heures;

6° Monter les coupes dans le baume dissous dans l'éther.

On obtient de la sorte des préparations dans lesquelles les spirilles apparaissent nettement différenciés au milieu des éléments cellulaires qui les renferment.

II

SPIRILLOSE DES JEUNES POUSSINS

Les jeunes poussins âgés de 1-4 semaines succombent sans exception à l'injection par le spirille de Sacharoff. Il suffit, pour donner la maladie à l'un de ces jeunes animaux, de lui injecter sous la peau quelques gouttes de sang provenant d'une oie malade. L'incubation varie de 1 à 4 jours : elle est d'autant plus

courte que l'animal est plus jeune ; elle est de 3 jours en moyenne chez un poussin de 2 semaines. Les spirilles, sitôt apparus dans le sang, s'y multiplient avec une rapidité extraordinaire, et l'animal meurt 24 heures environ après cette apparition, avec une masse colossale de spirilles dans les vaisseaux. A l'autopsie on observe une congestion intense du péritoine qui ne renferme ni exsudat liquide ni dépôts fibrineux; le foie est hyperhémié ; le péricarde renferme un exsudat clair assez abondant ; la rate est très tuméfiée, résistante lorsque l'incubation a été courte, d'une consistance molle et friable quand cette incubation a duré davantage. Il y a dans le sang une hypoleucocytose très marquée, mais portant exclusivement sur les polynucléaires ; la proportion des lymphocytes est au contraire fort élevée.

Le sang retiré au moment de la mort fourmille de spirilles très mobiles ; ces derniers se présentent à l'état isolé ; souvent aussi ils s'accolent sous forme de mèches ou d'écheveaux. Les spirilles sont entiers et jamais nous n'avons pu observer, dans le sang fraîchement retiré, d'individus dégénérés en chapelet ou de granulations libres. Si l'on prépare avec ce sang une goutte suspendue. maintenue à la température du laboratoire, on assiste aux modifications suivantes ; très rapidement, en un espace de temps variant de 20 minutes à 1 heure, on voit les spirilles s'agglomérer d'abord en gros pelotons enchevêtrés, de forme irrégulière. Les spirilles occupant le centre de l'amas s'immobilisent presque instantanément et se désagrègent en fines granulations ; cependant la surface du peloton continue à être abordée normalement par des spirilles nouveaux venus qui s'agitent pendant quelques minutes encore ; puis l'immobilisation des microorganismes s'étend du centre à le périphérie ; les phénomènes de bactériolyse également. et finalement le peloton entier se trouve transformé en un amas informe de granulations où la forme des spirilles n'est plus reconnaissable. Or, nous le répétons, jamais dans le sang fraîchement retiré nous n'avons vu rien de semblable ; on n'y trouve ni pelotons ni granulations ; par contre un grand nombre de spirilles en voie de division.

Le liquide péricardique contient en assez grande quantité des spirilles bien mobiles, sans trace de dégénérescence ; ils y sont bien moins nombreux que dans le sang. Dans les gouttes pendantes, à la température du laboratoire, les mouvements cessent

au bout 2 h. 1/2 à 5 h. 3/4. On y observe la formation de quelques pelotons, mais d'une façon beaucoup moins générale que dans le cas précédent; bon nombre de spirilles restent isolés et ne subissent pas la transformation granuleuse; l'exsudat péricardique contient très peu de leucocytes; ce sont presque exclusivement des lymphocytes.

La moelle des os renferme de nombreux spirilles, animés de mouvements très vifs; beaucoup sont en voie de division. Ça et là on rencontre quelques amas en forme de mèches; jamais de pelotons. D'ailleurs ces mèches se défont rapidement dans les gouttes pendantes, et les individus qui les composaient reprennent leur mobilité. En général nous avons constaté la formation de ces mèches là où les spirilles sont très nombreux et entassés dans un petit espace. Ces spirilles de la moelle sont toujours libres; nous n'en avons jamais trouvé à l'intérieur des phagocytes.

La rate contient un nombre colossal de spirilles mobiles, isolés, non réunis en mèches, et libres dans la plupart des cas. Cependant il nous est arrivé plusieurs fois de trouver sur nos frottis des phagocytes ayant englobé des spirilles. Ces phagocytes ne sont jamais des leucocytes polynucléaires, mais toujours de grands macrophages mononucléés, à noyau vésiculeux, contenant toute espèce de débris cellulaires, et renfermant aussi des spirilles; ces derniers ne sont point logés à l'intérieur de vacuoles, mais directement dans le protoplasme cellulaire; ils se colorent mal, la plupart du temps, mais ne sont point réduits en granulations. Le nombre de ces spirilles englobés est d'ailleurs très faible.

Sur des coupes du foie on constate qu'il existe des spirilles en très grande quantité à l'intérieur des vaisseaux; certains vaisseaux-portes sont presque obstrués par les microbes souvent agglomérés sous formes de mèches; jamais d'ailleurs on n'observe dans ces mèches de dégénérescence granuleuse; les spirilles s'y colorent bien. Ces derniers sont toujours extra-cellulaires.

En somme la mort survient chez les poussins avec une infection de tous les organes; l'accumulation des spirilles est particulièrement considérable dans la rate; et cependant ils y présentent une mobilité aussi grande que dans n'importe quel autre point de l'organisme. L'entassement des spirilles en ce point

s'explique très bien si l'on songe qu'à ce niveau il y a ralentissement très considérable du courant sanguin ; les particules en suspension y subissent des frottements multiples et un certain degré de stagnation ; d'où leur accumulation en ce point. C'est d'ailleurs là une condition tout à fait favorable à la phagocytose ; aussi voyons-nous un certain nombre des macrophages ayant englobé des spirilles.

Jamais, ni sur les coupes ni dans les frottis d'organes, on ne constate trace de phénomènes bactériolytiques, ou de modifications dans la forme ou la colorabilité des spirilles. Ces processus de dégénérescence sont au contraire des plus prononcés dans les gouttes suspendues et se produisent avec d'autant plus d'intensité que le nombre des spirilles est plus grand. Plus l'infection de l'animal est sévère, plus les processus d'agglutination et de bactériolyse sont énergiques *in vitro*. C'est là un fait que nous avons pu constater toutes les fois, sans exception.

Par suite de la perte accidentelle de nos spirilles, nous n'avons pu étudier leur mode de destruction chez les poulets adultes, naturellement réfractaires. Il y a là un point des plus intéressants à éclaircir.

III

ÉVOLUTION DE LA SPIRILLOSE CHEZ LES OIES

Voici comment évolue la maladie chez une oie adulte. On infecte l'animal en lui injectant sous la peau (à la face inférieure de l'aile, p. ex.) quelques gouttes de sang fraîchement prélevé à une autre oie en pleine infection. L'incubation dure 3 jours en moyenne ; elle est, comme on le voit, un peu plus longue que chez les oies russes ; ces dernières, plus petites de taille que la plupart des oies françaises, présentent une incubation de deux jours environ ; ayant eu au cours de nos expériences l'occasion d'expérimenter une fois sur un lot d'oies françaises, dont la faible taille se rapprochait du type russe, nous vîmes chez ces dernières la durée de l'incubation se réduire à deux jours.

La durée totale de l'infection sanguine, entre le moment de la première apparition des spirilles dans le sang jusqu'après leur disparition, est de 5 jours en moyenne. Les oies vieilles meurent

24 ou 48 heures après la disparition complète des spirilles ; les oies jeunes meurent le plus souvent en pleine infection, et avant que les spirilles n'aient disparu du sang.

A mesure qu'approche la fin de la maladie, l'animal cesse de manger; il devient languissant, il présente de la diarrhée, bientôt il s'affaisse, cesse de marcher et demeure accroupi, dans un état demi-comateux jusqu'à sa mort. La mort ne se produit pas, d'ailleurs, fatalement ; dans 1/10 des cas, nos animaux ont survécu, 1/5 se sont montrés réfractaires dans les expériences de M. Sacharoff.

La température des oies s'élève en général dès la 12e heure qui suit l'inoculation ; elle monte progressivement de 1 1/2° à 2° jusque vers le moment où les spirilles apparaissent dans le sang, atteignant ainsi 42°,5 ou 43°; puis elle commence à baisser un peu avant que le nombre des spirilles ait atteint son maximum, et décroit progressivement pour tomber, avant la mort, à 1 ou 2 degrés au-dessous de la normale. La défervescence, au lieu d'être brusque comme dans la fièvre récurrente, se fait donc ici « en lysis ».

D'une façon générale, l'injection des spirilles est suivie d'une hyperleucocytose totale qui, de 30,000 leucocytes par m. m. c. (chiffre moyen), monte à 50,000, 60,000 et plus.

Cette hyperleucocytose est peu sensible au début ; elle ne se manifeste nettement qu'à partir du moment où les spirilles apparaissent dans le sang. Le maximum de la leucocytose coïncide assez exactement avec le maximum de l'infection sanguine ; elle décroit ensuite et revient à la normale vers le moment de la mort. Si nous considérons les diverses catégories de leucocytes, nous voyons que le nombre des polynucléaires augmente progressivement pendant les premiers jours, puis baisse légèrement vers la fin pour revenir sensiblement au chiffre initial. De ce côté les phénomènes sont donc peu caractéristiques. Par contre, signalons la disparition constante des leucocytes éosinophiles pendant la dernière partie de la maladie.

Les spirilles, avons-nous dit, apparaissent en général dans le sang vers le 3e jour de la maladie ; d'abord peu considérable, leur nombre devient énorme 2 jours environ après leur apparition. A partir de ce moment ce nombre décroit, mais cette décroissance, au lieu de se faire brusquement comme dans la

fièvre récurrente, s'opère progressivement, en lysis, comme la température. Les spirilles mettent de la sorte 2 jours en moyenne pour disparaître du sang. Aussi emploierons-nous désormais les termes de « lyse » et « lytique » à la place de « crise » et « critique » peu appropriés à la spirillose d'oie. Alors que l'on n'en trouve plus dans le sang de la circulation générale, on les rencontre souvent encore en assez grande quantité dans le sang de la papille vasculaire logée à l'intérieur des plumes de l'aile; à ce moment on constate également leur présence dans l'épanchement péricardique qui, fréquemment, se produit vers la fin de la maladie.

Nous avons soigneusement observé la mobilité des spirilles aux diverses phases de la maladie : nos observations ont porté sur un grand nombre de cas et ont été faites d'heure en heure jusqu'au moment de leur complète disparition. Les résultats de ces observations ont été absolument constants; nous avons pu, de la sorte, nous convaincre que les spirilles gardent leur mobilité intacte, sans modification, depuis leur arrivée dans le sang jusqu'à leur départ; les derniers spirilles observés chez une oie arrivée au terme de sa maladie sont tout aussi mobiles qu'au début du processus infectieux. Alors que l'on ne trouve plus de spirilles dans le sang de la circulation générale, alors par conséquent que l'animal a achevé sa *lyse*, si l'on observe les spirilles encore présents dans la papille vasculaire des plumes, on constate que la mobilité de ces derniers n'est nullement affaiblie ; on les voit traverser comme des flèches le champ du microscope.

De plus, il nous est arrivé fréquemment de rencontrer des spirilles en voie de division dans le sang à la fin de la lyse. Bref, entre la mobilité et l'activité des spirilles au début de la maladie et à la fin de la lyse, nous n'avons jamais pu constater aucune différence.

On peut en dire autant de leur longévité; c'est ainsi que des spirilles ont gardé plus de 24 heures leur mobilité dans du sang recueilli pendant les dernières heures de la maladie ; au contraire, chez la même oie, les spirilles ont vécu moins de 2 heures dans le sang recueilli au fort de l'infection. Nous reviendrons avec détail sur cette question de la résistance des spirilles hors de l'organisme dans le prochain chapitre ; nous avons voulu simplement montrer ici qu'au moment de la lyse

la vitalité des spirilles n'est affaiblie à aucun point de vue.

Souvent, dans le sang frais, on observe des sortes de mèches ou d'écheveaux constitués par des spirilles accolés les uns aux autres dans le sens de leur longueur; parfois (fig. 4) ces écheveaux s'intriguent et forment des réseaux compliqués. Ces formations ne présentent d'ailleurs aucune stabilité; en effet, examinées en gouttes suspendues, elles se défont au bout de quelques minutes; les individus qui les composaient se séparent et se mettent à nager isolément sans avoir rien perdu de l'énergie de leurs mouvements. Il ne s'agit par conséquent pas ici de phénomènes d'agglutination.

Rien n'est d'ailleurs moins constant que l'apparition de ces écheveaux spirillaires; chez certaines de nos oies, nous n'avons jamais pu, malgré toute notre attention, constater, à aucun moment, de formations semblables; chez d'autres, nous les avons vu apparaître aux périodes les plus diverses de la maladie; parfois on les rencontre au 2e jour de l'infection sanguine pour ne plus les retrouver ensuite; il est, par contre, excessivement rare de les observer pendant la lyse; on peut dire d'une façon générale que plus les spirilles sont entassés en grand nombre dans un espace restreint, plus ils ont une tendance à s'accoler de la sorte. Enfin, on observe ces formations surtout chez les oies jeunes qui meurent sans faire leur lyse.

Après tout cela, il apparaît comme bien évident que la formation d'écheveaux spirillaires dans le sang n'a aucune relation avec la disparition des spirilles; c'est d'ailleurs ce que démontre clairement l'étude de la maladie chez les jeunes poussins : dans ce cas, en effet, le nombre des spirilles va en augmentant jusqu'à la mort de l'animal, et l'on observe dans le sang des écheveaux d'autant plus nombreux que le dénouement est plus proche.

Jamais il ne nous a été possible de constater dans le sang frais, à un stade quelconque de la maladie, de phénomènes de bactériolyse; jamais nous n'avons vu les écheveaux spirillaires se désagréger en granulations. A aucun moment non plus, malgré l'attention toute particulière apportée sur ce point, nous n'avons observé, dans le sang, de spirilles morts ou immobiles.

Les deux lésions les plus caractéristiques que l'on observe à l'autopsie d'une oie morte après la fin de la lyse, sont la dégéné-

rescence graisseuse du foie et la tuméfaction de la rate. Le foie est parsemé dans toute son épaisseur d'îlots jaunâtres de dégénérescence graisseuse. On ne commence à observer cette lésion que deux ou trois jours après l'apparition des spirilles dans le sang.

Quant à la rate, plus l'animal est mort à un degré avancé de la maladie, plus cet organe est volumineux, plus sa consistance est molle. Elle est presque diffluente chez ceux qui ont complètement achevé leur lyse, tellement elle est gorgée de sang. Parfois, à la coupe, on la trouve parsemée de petits lymphomes jaunâtres, du volume d'une tête d'épingle, et composés exclusivement de macrophages mononucléaires. On observe souvent, vers la fin de la maladie, un épanchement péricardique, clair, pauvre en cellules. Quant au péritoine, il ne renferme ni exsudat ni dépôts fibrineux; rien que des phénomènes banals d'hyperhémie. Les reins sont très fortement congestionnés.

Voyons maintenant quelle est, pendant l'infection sanguine, la distribution des spirilles dans les divers organes, et demandons-nous en quels points de l'organisme on les retrouve encore, après qu'ils ont disparu du sang.

D'une façon générale, on peut tout d'abord constater qu'après la lyse on ne trouve plus de spirilles dans les vaisseaux du cerveau, des reins ni des poumons.

Au contraire, la rate joue un rôle des plus importants pendant toute la durée de l'infection, aussi bien au moment où les spirilles pullulent dans les vaisseaux de la circulation générale, qu'après la fin de la lyse.

Nous n'avons pas eu l'occasion d'observer de rate au 1er jour de l'apparition des spirilles; il est néanmoins probable que les spirilles s'y montrent en même temps que dans le sang : en effet, dès le 2e jour de l'infection sanguine, on trouve dans la rate des spirilles en quantité notable, tous très mobiles et ne présentant aucune déformation morphologique. Dans le cas unique que nous avons observé à ce stade de la maladie, les spirilles étaient libres ; nous n'en avons point trouvé à l'intérieur des phagocytes.

Au contraire, dès le 3e jour de l'infection sanguine, on constate dans la rate une énergique réaction phagocytaire; sur les frottis, à côté de spirilles libres, non dégénérés, on observe un

nombre assez considérable de spirilles enfermés dans les phagocytes. Ces derniers sont toujours de grands macrophages mononucléaires, à noyau vésiculeux, à protoplasme très abondant et renfermant des inclusions de toute espèce; certains sont bondés de spirilles et nous en avons compté jusqu'à 11 dans la même cellule. Les microorganismes sont tantôt logés directement dans le protoplasme, tantôt enfermés dans une grande vacuole claire à l'intérieur de laquelle ils sont pelotonnés sur eux-mêmes. Cependant au début de l'infection le nombre des macrophages à vacuoles est faible. Sitôt englobés, les spirilles perdent rapidement leur colorabilité; comme, d'autre part, le protoplasme des phagocytes prend fortement la fuchsine, les microbes englobés demandent, pour être distinctement vus, un éclairage très puissant. A l'intérieur des phagocytes ils semblent être dissous en bloc, sans se résoudre en granulations. Jamais, non plus qu'à aucun autre stade de la maladie, on n'en trouve à l'intérieur des polynucléaires. D'ailleurs le nombre des polycIunéaires présents dans la rate est minime.

C'est au 4e et au 5e jour de l'infection sanguine que l'on trouve le plus de spirilles dans la rate; le nombre des microbes libres est extrêmement considérable: ils conservent toute leur mobilité; d'autre part la phagocytose est intense. Au moment de la lyse le nombre des spirilles libres devient faible; c'est à ce moment, au contraire, qu'on en rencontre le plus grand nombre à l'intérieur des macrophages. Quand les spirilles ont complètement disparu du sang, on continue à en rencontrer çà et là, dans la rate; mais ces individus libres sont en quantité peu considérable; les phagocytes, par contre, en contiennent en abondance; mais ils y dégénèrent rapidement et deviennent, en très peu de temps, invisibles. La fin de la lyse est caractérisée par la formation très abondante, dans les macrophages, de vacuoles digestives, contenant souvent des spirilles.

On peut, de la sorte, se convaincre que l'activité phagocytaire s'exerce dans la rate tout le temps que dure l'infection; elle devient de plus en plus énergique à mesure qu'approche la fin de la lyse, pour acquérir très rapidement une intensité considérable au moment où les spirilles disparaissent du sang. Il y a là, vraisemblablement, une accoutumance qui se fait progressivement chez les phagocytes, ainsi qu'en témoigne le nombre tou-

jours croissant de vacuoles digestives que l'on observe à l'intérieur de ces éléments. Les coupes de la rate sont des plus intéressantes à étudier au moment où les spirilles viennent de disparaître du sang. Tout d'abord les lacunes vasculaires et les capillaires veineux de l'organe frappent par leur état de distension ; elles sont gorgées de sang ; à l'intérieur de ces lacunes se trouvent d'énormes éléments cellulaires libres, isolés, à noyau vésiculeux, à protoplasme basophile ; ce sont les macrophages normaux de la pulpe de rate ; les vacuoles claires qui les distendent contribuent à leur donner cette taille colossale qui étonne au premier abord. L'état vacuolaire anormal de tous ces éléments est peut-être ce qu'il y a de plus caractéristique pour l'œil dans une rate lytique. En effet, le corps entier de la cellule est constitué par une colossale vacuole entourée d'un mince liséré protoplasmique contenant le noyau et des inclusions diverses. Il faut une certaine habitude de l'histologie de la rate pour reconnaître, dans ces formations complexes, des éléments cellulaires, et non la coupe d'un capillaire sanguin. C'est à l'intérieur de ces vacuoles que l'on peut observer les spirilles plus ou moins pelotonnés sur eux-mêmes ; parmi ces spirilles englobés, les uns se colorent assez vivement ; mais le plus souvent ils se présentent sous forme de filaments, à peine colorés, véritables ombres spirilliennes, qui indiquent combien l'action des sucs digestifs intra-cellulaires est rapide.

Il est assez rare de trouver à ce moment des spirilles libres dans la rate ; cependant çà et là on observe quelques individus isolés ou quelques mèches dans l'intérieur des artérioles, jamais à l'intérieur des veines ou des lacunes. Ces microbes libres se colorent avec intensité et ne présentent ni formes en chapelets ni granulations.

Il est bien certain après cela que c'est à l'intérieur des phagocytes habitant les lacunes de la pulpe que s'opère la destruction des spirilles. Jamais nous n'avons rencontré de microorganismes intra ou extra-cellulaires dans les glomérules de Malpighi, contrairement à ce que l'on observe dans la fièvre récurrente.

Que se passe-t-il dans la moelle des os pendant que la rate est le siège d'une destruction continue et progressivement croissante de spirilles? Depuis le moment où les spirilles font leur apparition dans le sang jusqu'à celui où ils en disparaissent,

on les rencontre en très grande quantité à l'intérieur des sinus de la moelle, en plus grande quantité même, semble-t-il, que dans la rate; mais ceci est une illusion due à ce fait que l'englobement par les phagocytes est ici très peu actif et ne commence que tardivement. C'est entre le 4e et le 6e jour de l'infection sanguine que la moelle contient le plus de spirilles; leur maximum correspond au moment de leur complète disparition du sang. On commence maintenant à rencontrer des macrophages contenant des spirilles; mais l'englobement est infiniment moins énergique que dans la rate, et fréquemment, à la mort de l'animal, alors que la destruction des microorganismes dans la rate est achevée, on trouve encore dans la moelle osseuse des spirilles libres en grand nombre. — Ces spirilles gardent d'ailleurs leur mobilité jusqu'à la fin; souvent, au moment où leur accumulation dans les sinus sanguins est la plus considérable, ils s'accolent sous forme de mèches; mais ces dernières se défont rapidement dans les gouttes suspendues et se résolvent en individus intacts et très mobiles. Jamais dans les frottis de moelle nous n'avons observé de spirilles granuleux ou dégénérés.

Le foie ne contient jamais de spirilles qu'en assez faible quantité. Nous n'avons pu observer d'englobement par les cellules étoilées de Kupfer.

On constate à la fin de la *lyse* que, dans le rein, les cellules épithéliales de la branche ascendante de Henle sont gonflées et atteintes de tuméfaction trouble.

De cette étude sur la marche de l'infection spirillienne chez les oies il résulte ceci : *les spirilles ne périssent pas dans le sang;* à aucun moment ils ne semblent gênés par la présence d'une substance bactéricide quelconque, puisque, du commencement à la fin, ils conservent, sans altération, leur forme, leur mobilité, leur aptitude à se reproduire. On n'y observe pas de phénomènes d'agglutination; on ne peut en effet faire rentrer dans cette catégorie la formation de mèches, qui d'une part se résolvent, dans les gouttes suspendues, en individus mobiles et vigoureux, et qui, de l'autre, cessent de se produire précisément au moment où le nombre des spirilles baisse dans le sang, c'est-à-dire au moment où le milieu devait être le plus bactéricide. — Jamais on n'observe non plus, dans le sang, d'englobement des spirilles par les phagocytes.

L'hypothèse du développement dans les humeurs de substances bactéricides, au moment de la lyse, tombe également devant ce fait que, après la disparition complète des spirilles du sang, on trouve encore, dans la papille vasculaire des plumes, des spirilles très mobiles en assez grand nombre; on en trouve aussi, à la même période, dans l'exsudat péricardique, où ils sont animés de mouvements énergiques.

Les spirilles ne périssent pas davantage dans les humeurs de la rate ou de la moelle des os. Là encore, ils conservent jusqu'à la fin leur mobilité; jamais on n'y observe de formes dégénérées en dehors des cellules. Leur accumulation dans ces organes s'explique par la structure anatomique de ces derniers. En effet, le sang des capillaires artériels venant à tomber dans les lacunes de la pulpe, il se produit à ce niveau une diminution brusque de la pression sanguine, un ralentissement considérable du courant et par là même un arrêt des particules en suspension; en outre, l'extrême état de division de ces lacunes traversées en tous sens par des brides conjonctives, encombrées de cellules de toutes sortes, y multiplie les frottements; ce sont là des dispositions éminemment favorables à la stagnation des corps solides entraînés avec le courant sanguin: très favorables par là même à l'englobement de ces corps par les phagocytes. C'est un phénomène analogue à celui que l'on peut constater dans l'infection péritonéale du cobaye par le vibrion cholérique; dans ce cas, en effet, on trouve un nombre considérable de vibrions accumulés dans les replis et sur toute la surface de l'épiploon, n'ayant d'ailleurs rien perdu de leur mobilité. Or, l'on constate en ce point un actif englobement des vibrions par les leucocytes polynucléaires, alors que les phénomènes de phagocytose sont presque nuls au sein de la masse de liquide qui distend le péritoine.

Ainsi donc, dès le début de l'infection spirillienne, un certain nombre de spirilles sont arrêtés dans les organes lacunaires et leur nombre va forcément en croissant. *Mais si l'accumulation des microorganismes se fait également dans la rate et la moelle osseuse, il n'en est pas de même de leur destruction.* Dans la rate, dès le début, les macrophages englobent et détruisent un certain nombre de spirilles; cet englobement devient de plus en plus énergique à mesure qu'approche la fin de la lyse: il se produit

là une accoutumance progressive des phagocytes spléniques, accoutumance qui aboutit à la destruction complète de tous les spirilles de la rate, et est rendue visible aux yeux de l'observateur par la formation de plus en plus abondante de vacuoles digestives. — Dans la moelle, cette accoutumance des macrophages se fait plus lentement et plus tardivement, si bien que, dans certains cas, il s'y trouve encore des spirilles libres au moment de la mort de l'animal.

Cependant, le plus souvent, la mort survient lorsque l'on ne trouve plus de spirilles libres en aucun point de l'organisme. Cette mort, se produisant malgré la destruction complète des agents pathogènes, est certainement un phénomène très remarquable.

Il est bien certain que, dans ce cas, les éléments de défense ne sont point parvenus à détruire les toxines microbiennes, et l'on doit rapprocher ce fait de cet autre, que les leucocytes polynucléaires n'interviennent à aucun moment au cours de la lutte, fait absolument anormal et qui n'est comparable à aucun cas connu. Les macrophages interviennent seuls dans le cas qui nous occupe, et leur intervention reste manifestement insuffisante.

Par suite de la perte accidentelle de nos spirilles, nous n'avons malheureusement pas pu poursuivre nos recherches ni étudier la marche de l'infection chez des oies naturellement réfractaires ou protégées par le sérum immunisant. L'unique observation faite par nous dans ce sens est la suivante : ayant injecté du sang contenant des spirilles dans la nageoire d'une oie possédant l'immunité naturelle, et ayant retiré, quatre heures après, une goutte d'exsudat au point d'inoculation, nous avons observé des spirilles à l'intérieur de deux leucocytes polynucléaires; cette observation unique montre quel intérêt il y aurait à étudier, chez des oies réfractaires, le mécanisme de l'immunité.

IV

ÉTUDES DES SPIRILLES DANS LES HUMEURS RETIRÉES DE L'ORGANISME

Examinons maintenant ce que deviennent les spirilles conservés hors de l'organisme dans le sang ou la lymphe retirés à

divers stades de la maladie. Pour faire un semblable examen, le procédé est des plus simples : on pique la membrane interdigitale ou bien une veine de la face inférieure de l'aile; au moyen d'une pipette on dépose une goutte du sang ainsi obtenu sur une lamelle que l'on renverse sur une lame creuse : on lute la petite chambre humide avec de la paraffine ou de la vaseline, et l'on observe à divers intervalles l'état des spirilles dans la préparation maintenue soit à 37°, soit à la température du laboratoire. On peut aussi emprunter la goutte de liquide à une plume jeune de l'aile; après l'avoir arrachée on recueille sur la lamelle le sang qui vient sourdre à l'extrémité : l'observation des spirilles dans ce milieu relativement pauvre en cellules est des plus faciles.

Soit une goutte de sang préparée de la sorte et fournie par une oie arrivée au 2e jour de l'infection sanguine. Au moment où l'on retire le sang, les spirilles sont bien mobiles, bien grouillants, ils sont isolés; si par aventure il existe quelques faisceaux de spirilles accolés, ces derniers ne tardent pas à se séparer et à reprendre individuellement leurs mouvements rapides. Au bout de 3, 4 heures, on observe, chez beaucoup d'entre eux, une tendance manifeste à s'agglomérer sous forme de pelotons ; pendant assez longtemps, les spirilles qui composent les pelotons présentent encore des mouvements vibratoires très rapides; puis ils s'immobilisent, ceux du centre en premier lieu, ceux de la périphérie en dernier. Dans le cas que nous analysons, 6 h. 35 après la confection de la goutte, à la température du laboratoire (20°), tous les spirilles contenus dans la goutte étaient immobilisés, les uns isolés, les autres sous forme de mèches, les autres enfin sous la forme des gros pelotons décrits plus hauts. Les spirilles sont entiers ; on n'observe aucun phénomène de bactériolyse. La préparation maintenue à 37° montre la même succession de phénomènes ; mais l'immobilisation complète est ici obtenue en 3 h. 50. C'est là ce qui s'observe dans un cas moyen. Quand le nombre des spirilles est très élevé, on observe fréquemment dans les gros pelotons des phénomènes de bactériolyse, surtout au centre de la masse ; en ce point, les spirilles se désagrègent et sont remplacés par un amas de très fines granulations.

Telle est la série des phénomènes qui s'accomplissent dans du

GOUTTES SUSPENDUES DE SANG DE L'AILE (Température du Laboratoire.)					
JOUR de l'infection du sang.	1er	2e	3e	4e	5e
Durée en heures de la mobilité des spirilles.	5 h. 40	6 h. 35	0 h. 52	3 h. 20	4 h.
	7 h. 40	2 h.	20 h.	1/2 h.	9 h. 30
		21 h.	3 h. 50	3/4 h.	
		2 h. 1/2	1 h. 25	1 h. 10	

GOUTTES SUSPENDUES DE SANG DES PLUMES (Température du Laboratoire.)						
JOUR de l'infection du sang.	1er	2e	3e	4e	5e	6e
Durée en heures de la mobilité des spirilles.	5 h. 1/2	19 h.	3 h.	4 h. 1/2	2 h. 43	29 h.
		43 h.	46 h.	1/2 h.	54 h.	47 h.
			26 h.	0 h. 40	40 h.	
			12 h.		31 h.	
					18 h.	
					16 h.	
					21 h.	

sang maintenu en goutte suspendue. L'intensité des phénomènes d'agglutination et le temps qui s'écoule jusqu'à l'immobilisation complète des spirilles varient considérablement d'un cas à l'autre. et, chez la même oie, d'un moment à l'autre. On pourra juger de cette variabilité d'après les tableaux de la p. 549; on y verra, pour chacun des jours de l'infection sanguine, le temps qui s'est écoulé jusqu'à l'immobilisation des spirilles maintenus à la température du laboratoire.

Il est aisé de se rendre compte, à l'inspection de ces tableaux, que la rapidité d'immobilisation ne croît nullement d'une façon régulière à mesure que l'on approche de la fin de la lyse : c'est là, au contraire, un phénomène essentiellement variable, puisque. en effet, nous voyons les spirilles perdre, au 3e jour de l'infection sanguine, leur mobilité au bout de 52 minutes et de 1 h. 25, tandis qu'au 5e jour nous les trouvons encore mobiles au bout de 9 h. Chez la même oie (oie n° 12) nous voyons les spirilles de la lymphe s'immobiliser au 1er jour. au bout de 5 h. 1/2, garder au contraire leur mobilité plus de 46 h. au 3e jour de l'infection sanguine.

Si nous examinons le tableau de la longévité des spirilles dans le sang des plumes, nous voyons que, d'une façon générale, c'est au 5e jour de l'infection sanguine qu'ils vivent le plus longtemps dans les gouttes suspendues, conservant leur mobilité 54 h., 40 h., 31 h., 16 h., 18 h., 21 h., à un moment où la disparition des spirilles du sang est presque complète : au contraire, nous les voyons périr, au 4e jour, au bout de 4 h. 1/2, 1/2 h., 40 minutes, alors que leur pullulation est à son maximum. La longévité des spirilles dans les gouttes suspendues est donc tout à fait indépendante de la période de la maladie et des chances de survie de l'animal. Par contre, il existe un rapport constant et facile à constater entre la longévité des spirilles et leur nombre ; on peut affirmer que, d'une manière générale, plus le nombre des spirilles présents est considérable, moins leur survie est longue. Les spirilles. dans le sang lytique, vivent hors de l'organisme d'autant plus longtemps que leur nombre est plus faible ; au contraire, c'est au moment où la pullulation dans le sang est la plus forte, c'est-à-dire vers le 4e jour, que la durée de leur vie dans les gouttes est moindre.

Aussi voyons-nous les spirilles se conserver très longtemps

dans le sérum sanguin, quand leur nombre y est faible : nous les avons vus vivre 43 h. dans du sérum du 2e jour, 48 h. dans du sérum du 3e jour, 39 h. dans du sérum lytique du 5e jour. Il semble donc qu'en dehors de l'organisme leur immobilisation plus ou moins rapide, comme aussi leur tendance plus ou moins grande à s'agglomérer en pelotons, soient sous la dépendance de quelque substance toxique sécrétée par eux.

Somme toute, nous retrouvons ici la confirmation de ce que nous avait enseigné l'observation si instructive *in vitro* du sang des poussins atteints de spirillose. Ici et là la longévité des spirilles hors de l'organisme est en raison inverse de leur nombre. D'une façon générale, on peut constater que l'immobilisation se fait, à 37°, dans un temps 2, 3 et 4 fois plus court qu'à la température du laboratoire.

A côté de ces phénomènes d'immobilisation, d'agglomération et même de bactériolyse, phénomènes d'ordre absolument artificiel, et sans le moindre rapport avec l'état de résistance de l'organisme, on peut, fréquemment, constater, dans le sérum recueilli *in vitro*, l'apparition de propriétés bactéricides d'autant plus énergiques que le sang a été recueilli à un moment plus rapproché de la lyse. En voici un exemple : à une goutte de sang riche en spirilles on ajoute une goutte de sérum provenant de l'oie n° 8, avant sa lyse : les spirilles gardent leur mobilité environ 3 heures. Au même sang, nous ajoutons du sérum recueilli chez la même oie, à la fin de sa lyse : au bout de 1/2 heure, tous les spirilles sont immobilisés dans le mélange, en partie agglomérés en pelotons ; parmi ces derniers, plusieurs subissent la dégénérescence granuleuse. L'action bactéricide du sérum n'est pas ici niable. Mais l'apparition de ces propriétés au moment de la lyse est loin d'être un phénomène constant.

En voici un exemple : on prélève à l'oie n° 19, au 3e jour de l'infection sanguine, du sang pour en préparer des gouttes suspendues : les spirilles y sont immobilisés au bout de 3 h. 50. Si à ces gouttes nous ajoutons du sérum de l'oie n° 18, ayant terminé sa lyse, on constate que les spirilles sont encore bien mobiles au bout de 5 heures. Dans ce cas, la survie a été plus longue au contact du sérum lytique que dans le sang de 3 jours ; l'apparition dans le sérum de propriétés bactéricides est donc

soumise aux mêmes variations que la plupart des phénomènes observés *in vitro*.

Nous n'insisterons pas davantage sur cette partie de nos expériences. M. Gabritchewsky dans son travail a minutieusement établi la présence de substances bactéricides dans le sérum lytique. Nous renvoyons donc à ses observations, en insistant seulement sur le peu de constance de ces phénomènes.

De l'ensemble de ces expériences, il résulte que les spirilles du sang ou de la lymphe meurent dans les gouttes suspendues, s'y agglomèrent et s'y désagrègent, sans que l'on puisse le moins du monde établir une relation entre l'intensité de ces phénomènes d'une part et l'évolution de la maladie de l'autre; ils sont au contraire étroitement liés au nombre des spirilles, et apparaissent plus vite à 37° qu'à une température plus basse.

Quant au pouvoir bactéricide du sérum, il croît souvent, mais non constamment, à mesure que l'on se rapproche de la fin de la crise. Tous les phénomènes que nous venons d'étudier, parfaitement réels et faciles à constater, ne sont cependant que des productions artificielles, opérées en dehors de l'organisme. Plus en effet l'on se rapproche des conditions physiologiques, telles qu'elles sont réalisées chez l'être vivant, plus ces phénomènes s'atténuent. La démonstration en est aisée à donner si l'on fait l'expérience suivante :

Arrachons à une oie malade une plume jeune de l'aile, contenant à l'intérieur de sa hampe la papille conjonctive vasculaire qui renferme, au milieu d'un lacis de capillaires sanguins, de grands espaces lymphatiques gorgés de lymphe. On prépare une goutte suspendue avec le sang qui vient sourdre à l'extrémité de la plume et l'on compare de temps en temps l'état des spirilles contenues dans la goutte à celui des spirilles demeurés dans la plume, plume et goutte étant maintenues dans des conditions de température identiques. Il est aisé de s'assurer que la survie des spirilles est infiniment plus longue dans la plume que dans la goutte ; la plume réalise en effet un ensemble de conditions infiniment plus voisines des conditions normales, que la chambre humide. En voici un exemple :

Oie n° 21. — Au 1[er] jour de l'apparition des spirilles dans le sang on arrache une plume de l'aile et l'on prépare une goutte suspendue avec le sang exsudé. Spirilles très nombreux et très

mobiles. Ils sont immobilisés dans la goutte au bout de 5 h. 1/2 : à ce moment ils sont extrêmement mobiles à l'intérieur de la plume; 24 heures plus tard ils ne présentent encore dans la plume aucun symptôme d'immobilisation : la survie a été donc ici 5 ou 6 fois plus longue que dans la goutte.

On recommence chez l'oie n° 21 la même expérience au 4[e] jour de l'apparition des spirilles. Les spirilles sont immobilisés dans la goutte au bout de 1/2 heure; 6 heures plus tard on prélève à la plume une nouvelle goutte ; les spirilles y grouillent et sont fort mobiles; l'immobilisation est complète au bout de 40 minutes. Deux heures plus tard, la plume ne renferme que des spirilles bien mobiles, etc.

Cet exemple prouve bien que si les spirilles périssent dans la goutte, cela ne tient nullement à un état spécial des humeurs chez l'animal vivant, puisqu'au même moment, à l'intérieur de la plume, les microorganismes ne présentent ni immobilisation ni agglutination.

Cette expérience, bien des fois renouvelée, nous a fourni des résultats constants. Si l'on fait l'expérience à 37°, l'ensemble des phénomènes d'immobilisation marche plus rapidement; tous les spirilles sont immobiles par exemple au bout de 1/2 heure dans la goutte, au bout de 6 heures dans la plume.

V

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1°) Les conditions de milieu dans lesquelles vivent les spirilles conservés *in vitro* ne ressemblent en rien aux conditions biologiques réalisées dans l'organisme vivant; d'autre part il n'existe aucune relation entre la longévité des spirilles *in vitro* et les chances de survie de l'animal malade. Nous avons vu les spirilles périr en moins de 1 heure dans le sang recueilli au plus fort de l'infection; nous les avons vus survivre 2 et 3 jours dans le sang recueilli à la fin de la lyse. Ce fait, maintes fois observé, est incompatible avec l'hypothèse de l'apparition de propriétés bactéricides dans le sang au moment où les spirilles disparaissent. Enfin nous avons constamment observé que dans le sang des jeunes poussins, recueilli peu de temps avant la mort, les

spirilles meurent et se désagrègent presque instantanément, alors qu'ils pullulent à l'aise dans l'organisme vivant. Ces jeunes animaux périssent sans exception avec une quantité colossale de spirilles dans le sang, et c'est justement dans ce sang que se manifestent, *in vitro*, les propriétés bactériolytiques les plus énergiques. Nous avons, comme M. Gabritchevsky, vu les microorganismes « fondre » sous nos yeux dans les gouttes suspendues; mais cela, jamais dans un sang lytique, toujours au contraire dans un sang où la pullulation des spirilles était à son maximum.

Quant à l'assimilation établie entre les phénomènes de bactériolyse observés *in vitro* chez les spirilles et le « phénomène de Pfeiffer », nous ne pouvons l'accepter. Le phénomène de Pfeiffer n'est point un phénomène de bactériolyse : il ne se produit pas chez des vibrions morts ; c'est un acte essentiellement biologique, une transformation morphologique du vibrion vivant, qui, dans des conditions déterminées, peut ensuite revenir à sa forme primitive; au contraire, la désagrégation des spirilles est un phénomène nécrotique, qui se produit chez des microorganismes morts. Jamais nous ne l'avons vu se produire chez l'animal vivant, dans le sang en circulation.

2°) Il existe un rapport constant entre le nombre des spirilles et leur longévité *in vitro*, leur résistance étant, dans ces conditions, en raison inverse de leur nombre.

C'est au début de l'infection et vers la fin de la lyse que leur survie est la plus longue dans les gouttes suspendues ; c'est au moment du maximum de leur pullulation qu'ils meurent le plus vite, et cela, non seulement chez les oies vieilles qui parcourent le cycle de la maladie tout entier, mais aussi chez les oies jeunes qui meurent avant la fin de la lyse, et chez les jeunes poussins qui meurent en pleine infection. Il est probable que dans ce cas les spirilles sont tués par quelques produits solubles qu'ils sécrètent autour d'eux. C'est sous l'influence des mêmes conditions que se produisent les phénomènes de pelotonnement et de bactériolyse. Il suffit souvent de diluer le sang où fourmillent les spirilles pour étendre considérablement leur survie. C'est ainsi que dans un cas il nous est arrivé de prolonger la vie des spirilles de plusieurs heures en ajoutant à la goutte suspendue du sérum sanguin provenant d'une oie parvenue à la fin de sa lyse.

3°) La remarque, qui termine le paragraphe précédent, nous démontre que si, dans bien des cas, on peut voir apparaître des propriétés bactéricides dans le sang lytique conservé *in vitro*, c'est là un phénomène qui est loin d'être constant. Nous avons vu le sérum lytique d'une oie, porté au contact de spirilles bien vivants, les tuer en 1/2 heure, tandis que le sérum fourni par cette même oie, avant sa lyse, les laissait vivre plusieurs heures. Mais nous avons pu également faire l'observation inverse. Et d'ailleurs le fait que les spirilles vivent plusieurs jours dans le sang des plumes, après la terminaison de la lyse, prouve bien combien cet état bactéricide des humeurs lytiques est inconstant et variable. Si le sang renfermait réellement au moment de la lyse des substances bactéricides, on verrait les spirilles s'y agglutiner et y périr *in vitro*, d'autant plus rapidement que la lyse serait plus avancée. Or, c'est exactement le contraire qui a lieu.

4°) Immobilisation extra-cellulaire des spirilles, agglomération en peloton, bactériolyse, tous ces phénomènes sont parfaitement réels, faciles à constater *in vitro*, mais *in vitro* seulement. Rapprochons-nous des conditions normales, physiologiques, l'énergie des ces manifestations diminue. C'est ainsi que la survie des spirilles est infiniment plus longue dans une plume arrachée à l'aile que dans une goutte suspendue préparée avec du sang emprunté à cette même plume.

Au contraire, l'observation directe de l'organisme vivant nous montre que rien de pareil ne s'y passe. Les spirilles dans le sang circulant conservent leur mobilité depuis le moment de leur apparition jusqu'à la fin de la lyse : ils conservent également la propriété de se reproduire.

Jamais, ni dans le sang, ni dans les organes, ni dans les frottis, ni dans les coupes, nous n'avons observé de bacilles morts, dégénérés, en dehors des cellules ; jamais nous n'avons pu constater la formation de pelotons ; jamais nous n'avons rencontré de phénomènes de bactériolyse ; jamais non plus nous n'avons pu voir sur des coupes les formes en chapelet décrites par M. Mamourowsky et par M. Gabritchewsky. L'observation directe des faits démontre à l'évidence que les phénomènes observés dans les gouttes suspendues diffèrent totalement de ceux qui se passent dans l'organisme vivant. Il n'est

pas permis de conclure des premiers aux seconds. M. Gabritchewsky, après avoir déclaré que les phénomènes agglutinatifs ou bactériolytiques observés *in vitro* sont étroitement liés à telle ou telle phase de la maladie (ce qui est certainement exagéré), ajoute « qu'il n'existe aucune raison pour expliquer ces phénomènes par des modifications *post mortem* du sang. » Il en existe une, au contraire, et bien simple : c'est que *jamais* il n'est donné d'observer de semblables manifestations dans l'organisme vivant. M. Gabritchewsky, qui recherche l'origine des phénomènes de bactériolyse dans la phagolyse, admet que *logiquement* des phénomènes analogues *doivent* se passer dans l'organisme où tant de leucocytes périssent perpétuellement dans le sang. Nous ne pouvons admettre cette dernière affirmation. Jamais on ne rencontre dans le sang de leucocytes dégénérés ; nous savons au contraire que tout leucocyte affaibli est aussitôt saisi et détruit par les grands macrophages de la rate, du foie, des ganglions lymphatiques et de la moelle des os. La croyance à une destruction perpétuelle de leucocytes dans les humeurs est une hypothèse gratuite que contredit tout ce que nous savons de la lutte des cellules entre elles. La phagolyse observée dans la production du phénomène de Pfeiffer est une production tout artificielle qui cesse précisément de se produire dès que les leucocytes se mettent à affluer.

5.) Les spirilles ne se détruisent pas dans le sang. On n'y observe jamais d'englobement par les phagocytes. La destruction s'opère dans la rate, à l'intérieur des grands macrophages de cet organe. Les polynucléaires n'interviennent jamais, comme dans la fièvre récurrente, et c'est peut-être à l'abstention des microphages qu'est dû ce fait paradoxal de la mort, chez un animal débarrassé de ses germes pathogènes. Cette destruction des spirilles dans la rate commence dès le début de l'infection sanguine ; elle augmente d'intensité à mesure qu'approche la fin de la crise ; l'adaptation progressive des phagocytes est rendue visible à l'œil de l'observateur par le nombre toujours croissant de vacuoles digestives qui s'y forment à mesure que le dénouement approche.

Les spirilles libres de la rate et de la moelle des os conservent jusqu'à la fin leur mobilité. Là non plus on n'observe jamais de destruction extra-cellulaire des microbes.

La conclusion de tout cela c'est que l'on ne peut attribuer à des influences humorales la destruction des spirilles chez l'animal vivant ; les propriétés bactéricides ne se développent dans le sérum qu'en dehors de l'organisme, et cela avec une énergie d'autant plus grande que l'on s'éloigne davantage des conditions physiologiques. D'ailleurs l'apparition de ces propriétés dans le sérum est aujourd'hui un fait bien connu chez les animaux de laboratoire vaccinés contre le choléra, le vibrio Metchnikowii, le streptocoque, le rouget du porc, etc.; l'on sait également qu'ils ne correspondent à rien d'analogue dans les tissus de l'animal malade. Entre les phénomènes observés *in vitro* et ceux qui s'accomplissent chez l'être vivant, aucun rapport n'existe ; c'est là une vérité prouvée aujourd'hui par des observations infiniment nombreuses ; la méconnaître c'est s'exposer à errer indéfiniment, sans progrès possible, dans l'explication des actes de la vie cellulaire.

EXPLICATION DES PLANCHES V ET VI

N° 1). — Sang d'oie avant le début de la lyse. (a) Spirilles en segmentation.

N° 2). — Sang d'oie vers la fin de la lyse. — (a) Spirilles en segmentation.

N° 3). — Coupe d'un sinus de la rate chez un très jeune poussin mort avec une masse de spirilles dans le sang.

N° 4). — Sang d'oie avant le début de la lyse. Cas à spirilles très nombreux ; formation d'écheveaux.

N° 5). — Macrophages contenant des spirilles. Frottis de rate fait avant la fin de la lyse.

N° 6). — Frottis de moelle osseuse un peu avant la fin de la lyse. Il n'y plus à ce moment qu'un très faible nombre de spirilles dans le sang. — (a) Spirilles en segmentation.

N° 7 et n° 8). — Coupes des sinus de la rate chez des oies au début de la lyse. Spirilles nombreux dans le sang. Macrophages renfermant des spirilles à l'intérieur d'énormes vacuoles.

N° 9). Grand sinus de la rate tout au début de la lyse. Les spirilles sont encore nombreux dans le sang.

N° 10). — Grand sinus de la rate à la fin de la lyse. Le sinus est gorgé d'hématies. Les spirilles ont complètement disparu du sang.

LES MICROBES DANS LES RÉGIONS ARCTIQUES

Par le Dr LEVIN, de Stockholm.

Dans la littérature des expéditions arctiques, les rapports concernant la bactériologie sont assez rares. Les recherches spéciales du Dr Nyström [1], médecin de l'expédition de la *Sofia*, en 1868, sont presque les seules faites sur la fermentation et la putréfaction au Spitzberg. Sur l'avis de Pasteur,— qui déjà avait commencé des expériences sur les bactéries de l'air des sommets de la Suisse, et auquel Nyström avait demandé des conseils sur la meilleure méthode à employer pour son travail — Nyström avait emporté des infusions de viande, de levure, ainsi que de l'urine conservées dans des ballons stérilisés. Ces ballons furent ouverts plus tard sur différents points du Spitzberg, afin que le contenu fût exposé ainsi aux microorganismes de l'air. Le résultat de ces expériences, et de quelques autres qui ne semblent pas avoir été complètement terminées, fut que la putréfaction et la fermentation, ou tout autre changement de cette nature, firent tout à fait défaut, ou ne se produisirent que longtemps après le moment où on les aurait constatées dans des régions non polaires ; on peut trouver l'explication de ce fait dans le très petit nombre de microbes contenu dans l'air des pays arctiques. On ne fit d'ailleurs aucun examen microscopique du contenu des ballons, et on doit ajouter que les procédés de stérilisation qu'on employait alors ne répondent pas complètement aux exigences que nous avons aujourd'hui.

Nansen [2], dans son ouvrage *Fram sur les mers polaires*, dit au sujet de la vie organique dans les flaques sur les glaçons flottants : « Ces flaques d'eau douce sont produites au printemps sur la glace par la neige fondue : le fond est composé de petits

1. 1868. C. NYSTROM, Om fäsnings och forruttnelseprocesserna på Spetsbergen, Upsala, Läkareförenings förhandlingar, t. IV.
2. 1897. NANSEN, Fram öfver polar nafvet, page 563.

trous ronds (smalthalor) de quelques centimètres de largeur et un plus plus profonds que larges. » — Nansen dit qu'on a constaté au microscope que la vase brune trouvée dans ces « smalthalor » contenait non seulement des diatomées et des algues isolées, mais encore des infusoires et des flagellés; j'y ai même trouvé des microbes, ce qui prouve que ces régions elles mêmes n'en sont point exemptes.

Johansen[1] dit, dans son livre sur le voyage de Nansen, que le Dr Blessing put cultiver des bactéries qu'il avait trouvées dans de la vase où étaient des petits chiens morts. Par contre, dans l'air, il avait en vain cherché des bactéries.

Plusieurs savants et médecins, ayant fait partie d'expéditions dans les pays polaires, vantent toujours dans leurs rapports l'air si sain des pays arctiques, qui ne contient pas ces terribles germes de contagion appelés bactéries. Cette opinion a été émise pour la première fois par le professeur Nordenskiold[2], dans les mémoires qu'il a publiés sur son expédition au Spitzberg en 1864 : une citation de cet ouvrage me semble d'un intérêt tout particulier, puisqu'elle donne le témoignage éloquent d'une expérience qui concerne la pureté de l'air et l'absence de bactéries pathogènes dans l'air des pays polaires. En général, on ne prend pas de refroidissements au Spitzberg, quoique on soit journellement exposé à des changements de température qui dans les pays plus méridionaux auraient infailliblement tôt ou tard des suites sérieuses ; et on peut certainement affirmer qu'il est impossible de trouver sur la surface du globe un climat plus salubre et plus favorable à la santé que celui du Spitzberg en été. Pendant les trois étés où les expéditions suédoises ont séjourné dans ces parages, on n'a eu sur le navire aucun cas de diarrhée, de fièvre intermittente, de catarrhe ou d'aucune autre maladie.

C'est à l'absence de matières contagieuses dans l'air qu'on doit attribuer ces conditions si exceptionnellement favorables au point de vue hygiénique. Ces innombrables germes, qui, dans les pays plus méridionaux, remplissent l'air, diminuent sa transparence et causent, à ce qu'on croit, les épidémies qui dévastent les paradis de la terre, manquent absolument dans

1. Johansen. Med Nansen pa 86° 14', page 95.
2. 1867. A. E. Nordenskiold, Svenska expéditionen till Spetzbergen och Jan Mayen, page 74.

l'atmosphère polaire. Quoique de rapides changements de la température du corps semblent disposer à la fièvre, elle ne peut pas se développer par le fait même du manque absolu de germes, et nous ne serions nullement étonnés si dans, l'avenir, beaucoup de malades étaient envoyés dans ces régions septentrionales pour y regagner les forces et la santé.

Une longue expérience a établi que l'air des montagnes était particulièrement pur et libre de germes microbiens : aussi a-t-on établi de nombreux *sanatoria* sur les montagnes de la Suède, de la Norwège, du Tyrol, de la Suisse.

L'air des pays polaires et celui des hautes montagnes devaient donc, à en juger par l'absence de maladies infectieuses dans ces deux régions, se ressembler encore sur ce point que l'air des pays polaires devait être comme l'autre presque libre de bactéries. C'est pour en fournir une preuve scientifique que j'ai pris part l'été passé à l'expédition polaire de Natthorst, sur l'*Antartic*, et que j'ai fait des expériences sur l'air dans les régions arctiques.

Grâce à l'intérêt avec lequel le chef de l'expédition, le professeur Natthorst, a suivi mes travaux, grâce aussi à la grande obligeance avec laquelle on m'a aidé à transporter mon très lourd appareil aux endroits que je croyais propices, j'ai pu faire des expériences sur l'air dans vingt endroits différents.

Mes expériences ont commencé à Beeren Eiland et se sont continuées au Spitzberg et sur la terre du roi Charles aussi souvent que l'occasion s'en est présentée. L'appareil était monté ordinairement sur un point élevé, au pied d'un glacier, sur une haute falaise ou sur un rocher au bord de la mer. Quelquefois même, nous avons pris les échantillons à bord du navire. La méthode que j'ai employée a été celle de Pétri modifiée par Miquel. La filtration s'est faite soit sur de la poudre de sucre, soit sur un mélange de sucre pulvérisé et de sel marin, soit enfin avec du coton de verre. Ces filtres étaient adaptés à un appareil construit spécialement pour cet usage, et qui permettait d'aspirer une grande quantité d'air. La quantité totale que j'ai filtrée a été de 21,600 litres. A chacune de ces stations on a recueilli une proportion d'air qui variait suivant la résistance des filtres et la durée du temps où l'appareil fonctionnait, mais qui restait en moyenne de 1,000 litres. En général, chaque expé-

rience durait de 4 à 5 heures. J'avais l'habitude d'employer un double filtre; le premier recueillait les germes, le second permettait de s'assurer que tous les microbes avaient été arrêtés. Comme dernier contrôle, il y avait, derrière la seconde partie du filtre, une bourre de ouate stérilisée. Lorsque l'aspiration était terminée, les filtres étaient mêlés à de la gélatine liquide dans laquelle, quand elle s'était solidifiée, les microbes pouvaient développer leurs colonies. Quand le filtre était composé de sucre et de sel, on le faisait fondre dans un volume suffisant de gélatine liquéfiée. Dans toutes ces expériences, on ne put qu'une seule fois trouver des bacilles, et ce fut dans une épreuve faite à bord de l'*Antartic*, dans le port de Beeren Eiland. Cette expérience ne donna du reste que trois colonies fort rapprochées les unes des autres sur une des plaques. A en juger d'après le rapprochement de ces colonies, on est tenté de croire qu'un grain de poussière du navire s'était fourvoyé dans la gélatine, et y avait apporté les trois bacilles générateurs des colonies en question. Le filtre de contrôle était stérile dans cette occasion comme dans toutes les autres, de même que la bourre de ouate stérilisée mentionnée plus haut. Sur cinq épreuves, on a constaté un très petit nombre de colonies de moisissures, qui provenaient presque sûrement de l'air filtré, puisqu'elles étaient enveloppées de gélatine; excepté dans une épreuve cependant qui contenait huit colonies de moisissure dans 1,700 litres d'air, et dans une autre 27 colonies dans 740 litres. Dans ces deux occasions, les colonies étaient sur la surface et ne se produisirent qu'au bout de 14 jours environ.

Lorsque, sur une quantité d'air aussi grande que 20,000 litres, pris sur plusieurs points différents, on n'a trouvé que quelques moisissures, on est en droit de supposer qu'on a donné la preuve scientifique de la grande pureté de l'air et de sa pauvreté en microorganismes dans les régions arctiques, et que cette preuve scientifique s'accorde complètement avec l'expérience pratique.

J'ajouterai encore mes propres observations pour montrer combien cette atmosphère sans germes et sans poussière contribue à la salubrité extraordinaire des régions arctiques. Sans avoir eu de catarrhes du nez, de la gorge ou de la poitrine, si communs quand on sort par les temps humides, j'ai pu dans les

régions arctiques marcher plusieurs jours avec des habits et des souliers mouillés, m'exposer aux ouragans et à un froid de plusieurs degrés au-dessous de zéro dans des vêtements mouillés, m'étendre et dormir pendant des heures sur le sol humide sans aucune conséquence fâcheuse. Pendant les quatre mois que nous avons séjourné dans les régions polaires, nous avons tous joui de la plus excellente santé. Nous étions en tout 28 hommes, et nous n'avons eu qu'un seul cas de maladie : c'était un *icterus catarrhalis* avec *gastroenteritis* d'une nature très bénigne. Au bout de huit jours de diète et de laxatifs, notre malade était complètement remis. Il va sans dire que les écorchures et les petites blessures aux pieds et aux mains étaient plus fréquentes. J'ai trouvé que ces petites blessures, surtout celles des mains, étaient assez longues à guérir; sans en avoir de preuves positives, je crois cependant pouvoir dire que l'eau salée retardait dans une certaine mesure la guérison.

La cuisine bien faite et soigneusement approvisionnée de l'*Antartic*, ainsi que l'aménagement intérieur du navire aidaient sans aucun doute à la bonne santé générale. Nous avions beaucoup de place, et tout pouvait être lavé et nettoyé facilement. Or notre capitaine était un ardent apôtre de la propreté, et comme tout le monde le sait, « laver le pont » est un des plus grands plaisirs du marin. Quant à la quantité comme à la qualité des vivres, notre chef avait profité de l'expérience que le professeur Almquist avait acquise pendant l'expédition de la *Vega* autour de l'Europe et de l'Asie en 1878-1880. Les nombreux conseils vraiment pratiques qu'il donne dans son compte rendu nous ont épargné bien des ennuis.

On voit par ce qui précède la preuve incontestable de la salubrité des régions arctiques, que Nordenskiold proclamait déjà en 1867, et que bien d'autres depuis ont signalée avec raison. On voit aussi que les explications scientifiques qu'il prévoyait ont été reconnues exactes quand elles ont été soumises au contrôle des méthodes bactériologiques.

J'ai fait aussi, durant l'expédition de cet été, un grand nombre d'expériences sur la quantité de microbes contenus dans les différentes espèces d'eau : eau prise de la surface de la mer, eaux des ruisseaux découlant des glaciers, et autres eaux courantes. J'ai expérimenté aussi avec la glace des glaciers de la

mer et des « smalthalor » qu'on y trouve, avec la neige, ou ordinaire, ou verte, ou rouge; soit avec de l'argile rouge, jaune ou brune ou avec les dépôts formés sur les pierres qui bordent les ruisseaux. A l'aide d'un instrument spécial, j'ai fait 78 expériences avec l'eau prise à la surface de la mer. L'appareil comprenait d'abord une gaine de bois avec un couvercle et percée de petits trous; dans cette gaine se trouvait un tube en verre d'une contenance d'environ 20 c. c.; ce tube avait un col très étroit fermé par une bourre de ouate. Au fond de la gaine, un poids forçait l'appareil à plonger. Le tout était entouré d'un papier filtré stérilisé à 115°. Pour s'en servir, on ôtait le papier avec toutes les précautions nécessaires, puis l'appareil était lancé dans la mer du côté où l'eau n'avait pas encore été mise en contact avec le navire. L'appareil était immédiatement submergé et on le retirait aussitôt que les bulles d'air avaient disparu.

Le tube était alors à moitié ou aux trois quarts plein d'eau, et dans le goulot il y avait une petite colonne d'eau qui empêchait les poussières de pénétrer dans le liquide. On y mettait du reste de suite la bourre d'ouate. Je me suis servi aussi d'un appareil construit plus tard sur le même principe, mais avec quelques modifications, et qui me permettait de prendre des échantillons de 700 c. c. Cet appareil a, sur celui que j'ai décrit précédemment, l'avantage que les trous par lesquels l'eau doit entrer forment un cercle entre le deuxième et le troisième tiers de la hauteur de la gaine, et empêchent ainsi un grain de poussière qui serait tombé sur le couvercle de pénétrer à l'intérieur de l'appareil.

Tous les échantillons qui ont été pris contiennent des bactéries, mais en très petite quantité. Leur nombre, par centimètre cube, est en moyenne d'une bactérie par 11 c. c., ce qui doit être considéré comme extraordinairement satisfaisant, quand on sait que l'eau de mer sur les côtes de Suède en contient ordinairement 700 par centimètre cube, que dans les tuyaux si bien aménagés de la ville de Stockholm l'eau contient encore 30 bactéries par centimètre cube, et qu'enfin l'eau de la Seine peut en contenir jusqu'à 600,000 par centimètre cube. Les espèces de bactéries trouvées dans les échantillons d'eau des pays arctiques, ne sont pas encore déterminées, mais il semble qu'on en peut

reconnaître seulement deux différentes espèces qui donnent des colonies caractéristiques dans la gélatine.

Mes expériences avec l'eau des glaciers, des ruisseaux, avec la neige, la glace et la neige fondue, etc., sont au nombre de 80. Ces échantillons, pris pendant des excursions ou de petites expéditions parties du bateau, ont été conservés dans de grands tubes en verre de 200 c. c., enveloppés de papier-filtre et stérilisés à 180°. Lorsqu'on devait prendre les échantillons, on développait le papier sans toucher au tube, le bord du verre était chauffé au moyen d'une petite lampe à esprit-de-vin, et on faisait pénétrer l'échantillon, neige, eau ou terre dans le tube, après quoi la bourre de coton flambée était remise en place, et le tube enveloppé de nouveau dans son papier.

Le tube était déposé dans une boîte de fer-blanc, et de cette façon pouvait être transporté sans risques. On a pris également des échantillons dans des pipettes de Pasteur, qu'on fermait immédiatement au feu par les deux bouts. Ces expériences ont donné à peu près le même résultat que celles faites avec de l'eau de mer. Presque toutes contenaient des bactéries; pourtant si l'on considère seulement les espèces, la quantité de bactéries par centimètre cube a été plus grande que dans la série précédente, particulièrement pour la neige.

Les études ont offert un intérêt tout spécial en ce qui concerne les bactéries trouvées dans les « smälthalor ». Je n'ai malheureusement pu prendre que 12 échantillons de la vase brune, dont j'ai parlé en citant les observations de Nansen. Ces échantillons ont été recueillis dans des pipettes stériles, soit dans un seul et même trou, soit dans huit ou dix trous différents. Dans trois cas seulement, on put constater des bactéries, ou, pour mieux dire, une seule bactérie dans chaque épreuve, car une seule colonie s'était formée sur chacune des trois plaques de gélatine. Si l'on songe aux difficultés qui entourent les laboratoires bactériologiques faits sur la glace et après sur le navire, on ne peut s'étonner qu'il en résulte quelque cause d'erreur. A mon avis, ces « smälthalor » ne contiennent point de bactéries, ou tout au moins ils en contiennent si peu, que même les bactériologues exercés ne les retrouvent à l'examen microscopique qu'avec la plus grande difficulté.

Les échantillons d'eau de mer des grands fonds ont été

prélevés en même temps que s'exécutaient les travaux d'hydrographie. Nous avons obtenu des matériaux propres à l'étude bactériologique, principalement dans les sondages du « Svenska djupet » et à l'ouest jusqu'aux glaces du Groenland. Nous avons pris en tout environ 90 échantillons pendant l'été. On fermait à la lampe un des bouts d'un tube de verre très épais, d'un diamètre d'un centimètre, et long de 20 c. c.; l'autre bout était très effilé et formait une longue pointe recourbée. Le tube chauffé à 200° était fermé immédiatement, ce qui le rendait tout à la fois stérile et presque vide d'air. Il était attaché à l'appareil hydrographique, la pointe recourbée tantôt en haut, tantôt en bas suivant la construction de l'appareil; l'effilure recourbée était placée de façon qu'elle fût introduite dans le réceptacle destiné à l'échantillon d'eau à l'épreuve. Quand l'appareil commençait à fonctionner, le couvercle était refermé et la pointe brisée à un endroit rendu à dessin plus faible.

L'eau se précipitait dans le tube qui était à peu près vide d'air, le remplissait jusqu'à plus des trois quarts de sa hauteur; lorsqu'on remontait le tube, l'eau avait tendance à sortir, la pression diminuant au fur et à mesure que l'appareil se rapprochait de la surface de l'eau. On a eu la plupart du temps la preuve que l'eau contenue dans le tube était bien celle qui s'y était précipitée lorsque la pointe avait été brisée par le couvercle, car lorsque l'échantillon était pris dans de l'eau à une température inférieure à zéro, l'eau demeurée dans la pointe était gelée. Deux ou trois et même une fois quatre de ces tubes ont été attachés à la machine hydraulique, et chacun d'eux contenait de 20 à 25 c. c. d'eau. On a aussi employé des tubes d'un autre modèle, mais lorsque, pour une raison quelconque, on n'avait pu attacher aucun tube, je me contentais pour mes expériences d'aspirer, avec des pipettes stérilisées, l'eau contenue dans l'appareil explorateur. Pour nous assurer qu'on pouvait se fier aux échantillons puisés de cette façon autant qu'aux autres, nous les avons soumis à un contrôle : les résultats des deux expériences ont été identiques. On ne doit pas s'en étonner, car lorsqu'on descend l'appareil à 1.000 et même à 3.000 mètres de profondeur, il est naturel que la colonne d'eau qui lave le petit récipient de cuivre le débarrasse de toutes les impuretés qui auraient pu s'attacher à ses parois. Il n'y a pas de différence bactériologique à faire

entre les échantillons pris à de grandes profondeurs et ceux qui ont été pris à la surface de l'eau. Un échantillon de 51 c. c. d'eau, pris à 2,700 mètres de profondeur et d'une température de — 1°,5 contenait 39 colonies de bactéries dont 10 liquéfiantes et 29 rondes et blanches, ne liquéfiant pas, et un autre échantillon de 60 c. c., à la température de + 3°, pris à 25 mètres de profondeur, contenait 15 colonies.

Ces résultats ont été les mêmes sur divers points des mêmes parages, et montrent une plus grande quantité de bactéries dans les grands fonds qu'à la surface.

Quant aux espèces, en outre des bactéries déjà désignées, rondes ou en forme de bâtonnets, il y en a une troisième qui semble dominer dans l'eau profonde, et qui est en forme de spirille.

Je dois ajouter ici que de nombreux essais de cultures anaérobies ont eu un résultat négatif.

L'existence des bactéries est donc la même sous tous les rapports dans les grands fonds et à la surface de la mer, quoique dans les grands fonds la température descende souvent au-dessous de 0°. Les études biologiques faites par Fischer et par d'autres sur l'existence des bactéries à différentes températures ont fait supposer que les microbes en question ne pouvaient vivre à une température supérieure à 50° ni inférieure à + 5° C. Cependant Globig a démontré qu'il en existe qui se reproduisent à une température variant de 50° à 70°. Forster et après lui Jahn ont affirmé que certaines bactéries phosphorescentes peuvent vivre et se multiplier à ± 0°. Cette intéressante étude biologique a maintenant trouvé une confirmation de plus dans mes expériences, puisqu'elles montrent que tout un monde de bactéries existe à une température qui descend jusqu'à 2° au-dessous de zéro.

J'ajouterai encore que plusieurs séries d'expériences ont été faites sur les intestins et le contenu des intestins de plusieurs animaux, tels que les ours blancs, les phoques, les requins, les eiders, les pingouins, les frégates, les mouettes noires, les guillemots, les oursins, les actinies, les crevettes, etc. — Les échantillons pour les vertébrés étaient pris de la manière suivante : après avoir ouvert l'abdomen avec précaution, on stérilisait avec du fer rouge la surface d'une circonvolution de

l'intestin et, au moyen d'une pipette, on en aspirait le contenu, lequel était immédiatement ensemencé dans du bouillon, sur gélose, et aussi dans de la gélatine. Pour les animaux invertébrés, on stérilise la surface au fer rouge, puis on puise dans l'intérieur, au moyen d'une pipette. On l'ensemence comme il vient d'être dit. Il résulte de toutes ces expériences que la plupart de ces animaux ont le contenu de l'intestin absolument stérile. Dans un ours blanc et dans deux phoques, on constata une seule espèce de bactéries, qui sur différents milieux nutritifs et au microscope ressemble au *bacterium coli commune*. Les intestins des oiseaux étaient complètement stériles, excepté ceux de la mouette à ailes blanches ; plusieurs individus de cette espèce, tués dans différents endroits, en même temps que d'autres oiseaux qui devaient servir aux expériences bactériologiques, avaient tous sans exception des bactéries dans l'intestin, et toutes de même espèce à ce qu'il nous a semblé. Chez presque tous les animaux inférieurs de la mer, on a pu constater la présence de bactéries isolées.

On pourrait objecter que dans les cas où je n'ai pas obtenu de culture, cela tenait à ce que les milieux de culture employés ne convenaient pas. Mais l'examen du contenu intestinal, coloré aux couleurs d'aniline, ne montrait pas de bactéries.

Pour démontrer l'importance de ces études, j'ajouterai que, en 1880, Pasteur s'est posé la question de savoir si les bactéries de l'intestin étaient indispensables à la digestion. Nencki, puis Nuttall et Thierfelder ont montré que la digestion pouvait s'accomplir sans l'intervention des bactéries. Ces derniers auteurs ont pu, à l'aide de l'opération césarienne, prendre de jeunes cobayes qui furent déposés dans des cages stériles et fournis d'air et de nourriture stériles. Un des petits cobayes vécut 8 jours : à l'autopsie, on trouva l'intestin stérile. Ils ont donc conclu que la digestion se faisait sans bactéries. Une seconde série d'expériences a confirmé les résultats de la première, mais la troisième série n'a en aucune façon aidé à résoudre le problème. Il était cependant du plus grand intérêt de trouver dans la nature elle-même la preuve que la digestion, du moins chez un grand nombre d'animaux, pouvait s'effectuer sans l'aide des bactéries.

LA CONSTITUTION DU POISON DIPHTÉRIQUE

Par Thorvald MADSEN.

PREMIÈRE PARTIE

(Travail du laboratoire de bactériologie médicale de l'Université de Copenhague.)

Les nombreuses tentatives faites pour découvrir la composition chimique des poisons bactériens sont restées sans résultat, et il y a peu d'espoir, pour le moment, d'aboutir prochainement dans cette voie. Les seuls réactifs que nous possédions pour le poison de la diphtérie, par exemple, sont les symptômes apparents observés chez des animaux injectés avec cette toxine. Ce sont ces faits surtout qui ont déterminé M. Ehrlich à publier ses travaux sur la constitution du poison diphtérique, travaux qui nous font connaître des conceptions tout à fait originales et ouvrent une voie nouvelle pour l'étude des poisons bactériens[1].

Le grand intérêt qu'ont éveillé ses travaux semble s'être porté principalement sur sa conception purement théorique de l'action des toxines sur l'organisme, sur sa théorie de l'immunité (*Seitenkettentheorie*) ; mais l'objet essentiel de ces mémoires, le travail colossal sur la constitution du poison diphtérique, n'a pas encore été, autant que je sache, l'objet d'aucune publication.

On s'expliquera pourtant assez facilement ce long silence en

1. Die Werthbemessung d. Diphtherieheilserums. *Klin. Jahrb.* 1897.
Ueber die Constitution des Diphtheriegiftes. *Deutsche med. Wochenschr.* 1898.

tenant compte du nombre d'expériences nécessaires pour un tel travail et du temps qu'il faut pour suivre les variations de la toxicité et du pouvoir fixateur des poisons diphtériques, variations qui correspondent à leur différenciation progressive. Seuls, les laboratoires dans lesquels on a procédé depuis des années déjà à des déterminations exactes des poisons diphtériques, peuvent aborder une telle étude.

Le laboratoire de bactériologie médicale de l'Université de Copenhague se trouve précisément dans ce cas, et c'est dans son service de sérothérapie qu'il m'a été possible d'exécuter des recherches sur les deux poisons mentionnés dans un travail antérieur[1], et dont les recherches contenues dans ce mémoire ne sont qu'une suite.

Quatre poisons diphtériques ont fait l'objet des recherches qui vont suivre. Ils ont été retirés des cultures des bacilles diphtériques dans du bouillon de veau ordinaire. Les cultures ont été filtrées après trois semaines d'étuve à 37° (les poisons *A* et *B* sur porcelaine, les poisons *C* et *D* sur papier), le liquide filtré a été émulsionné avec du toluol, puis conservé à l'abri de la lumière et à une température d'environ 15° sous une couche de toluol.

Les expériences ont été faites d'après la méthode de M. Ehrlich et enregistrées, autant que possible, sous la même forme que celle indiquée par lui.

Ensuite, me basant sur les résultats de mes expériences, je me suis efforcé de donner un résumé critique du travail de M. Ehrlich, et j'indique les modifications et les additions que mes observations m'autorisent à y faire.

M. Ehrlich a bien voulu me prêter son très précieux concours pour ces travaux : je lui dois non seulement des quantités abondantes des produits titrés de son laboratoire, mais aussi un grand nombre de renseignements précis et instructifs.

Pour faciliter la lecture de ces expériences, je commencerai par un résumé succinct des deux mémoires de M. Ehrlich, me bornant toutefois à ce qui a trait à la constitution du poison diphtérique.

1. Th. Madsen. Ueber Messung der Stärke des antidiphterischen Serums. *Zeitschr. f. Hyg.* 1897.

I

Notre unité de mesure pour le poison diphtérique est *l'unité de toxine* [1] T, c'est-à-dire la plus petite dose de toxine sûrement mortelle en 4 ou au plus 5 à 6 jours pour un cobaye de 250 grammes.

L'unité antitoxique, ou *l'unité immunisante* (I) est la quantité de sérum qui, par mélange *in vitro*, neutralise complètement 100 unités de toxine.

De nombreuses expériences ont fait voir à M. Ehrlich que les relations entre le poison diphtérique et le sérum antidiphtérique sont beaucoup plus complexes qu'on ne le supposait de prime abord.

Un exemple nous facilitera beaucoup l'exposé des observations d'Ehrlich.

Admettons un poison diphtérique dont (T) soit égal à 0,01 c. c., alors d'après notre définition (I) doit saturer 100 (T), c'est-à-dire 1 c. c. La quantité de poison qui est neutralisé par (I) est appelé par M. Ehrlich *Limite* o (L_0). (I) + L_0 est donc un mélange tout à fait neutre, ne contenant ni de la toxine libre ni de l'antitoxine libre : ce mélange reste complètement sans effet sur les animaux. En ajoutant à ce mélange 1 (T) on devrait supposer qu'on atteindra une autre limite, *Limite* † ($L_†$) représentant une quantité de liquide qui, mélangé avec (I), contiendrait 1 (T) libre. Le mélange (I) + $L_†$ représenterait donc exactement une dose mortelle pour cobaye.

1. Comme, sous le nom primitif de *toxine diphtérique*, on désigne tantôt le poison spécifique du bacille de la diphtérie, tantôt le liquide qui le tient en solution ; j'ai préféré, pour éviter des malentendus, réserver le nom de *toxine* à la substance toxique non modifiée, et j'appellerai *poison diphtérique* l'ensemble du liquide, c'est-à-dire le bouillon de culture complet contenant en solution la toxine libre et toutes ses modifications.

Dans le même ordre d'idées, il est important d'établir une distinction entre *l'unité de toxine* et la *dose minima mortelle*.

L'unité de toxine est la plus petite quantité de toxine proprement dite, nécessaire pour tuer un cobaye de 250 grammes en 4 jours environ.

La dose minima mortelle est la quantité de liquide, de *poison diphtérique*, contenant une unité de toxine libre.

Les auteurs allemands emploient souvent pour indiquer un cobaye de 250 grammes l'abréviation : M^{250}, et pour indiquer la dose minima mortelle pour un tel cobaye : † M^{250}. En français on pourrait écrire ce dernier signe † C^{250}.

J'emploierai dans mon travail les abréviations suivantes :

T, unité de toxine. — (T), dose minima mortelle

I, unité antitoxique. — (I) liquide contenant I en solution.

On aurait donc, pour ce poison, les « constantes » suivantes :

$$
\begin{array}{rcl}
(T) & = & 0,01 \text{ c.c.} \\
L\dagger = 1,01 \text{ c.c.} & = & 101\ (T) \\
L_0 = 1,00 \text{ c.c.} & = & 100\ (T) \\
\hline
\text{Diff. } (D) = 0,01 \text{ c.c.} & = & 1\ (T)
\end{array}
$$

En réalité, on trouve toujours que pour obtenir (L†), il faut ajouter à (I) + L_0 non pas 1 (T), (qui ne produirait qu'un œdème), mais beaucoup plus, par exemple 101 (T). Les « constantes » seraient donc :

$$
\begin{array}{rcl}
(T) & = & 0,01 \text{ c.c.} \\
L\dagger = 2,01 \text{ c.c.} & = & 201\ (T) \\
L_0 = 1,00 \text{ c.c.} & = & 100\ (T) \\
\hline
D = 1,01 \text{ c.c.} & = & 101\ (T)
\end{array}
$$

Dans les 101 (T) ajoutées, il n'y a donc qu'une seule (T) qui a pu produire ses effets toxiques et tuer un animal dans le temps déterminé. Il semble que les 100 (T) qui restent ont été fixées d'une façon telle qu'elles ne produisent pas d'effet.

Des phénomènes analogues ont été observés dans tous les poisons étudiés jusqu'à présent.

Pour expliquer le fait qu'une partie du poison semble disparaître de cette façon, M. Ehrlich suppose qu'un bouillon de culture diphtérique contient, en outre de la *toxine spécifique, des toxoïdes*, c'est-à-dire des modifications de la *toxine* qui ont perdu leur pouvoir de tuer les animaux, mais ont gardé celui de fixer l'antitoxine.

Partant de l'hypothèse que les toxines et les antitoxines se neutralisent mutuellement suivant les lois des équivalents, M. Ehrlich admet que, si une unité de toxine fixe une certaine quantité d'antitoxine, cette unité de toxine modifiée en toxoïde fixera exactement la même quantité d'antitoxine. Donc, pour l'antitoxine, un équivalent de toxine (toxine équ.) sera toujours égal à un équivalent de toxoïde (toxoïde équ.).

Les toxoïdes n'ont pas tous la même *avidité pour l'antitoxine*. On peut, *a priori*, subdiviser les toxoïdes en trois groupes :

1° Les *prototoxoïdes* qui ont une avidité plus grande pour l'antitoxine que la toxine;

2° Les *syntoxoïdes* possédant pour l'antitoxine une avidité égale à celle de la toxine;

3° Les *épitoxoïdes* ou *toxones* avec une avidité plus petite que celle de la toxine.

Nous verrons plus tard comment on peut montrer expérimentalement l'existence des deux premiers toxoïdes, que nous appellerons provisoirement tout court *toxoïdes*.

Maintenant, voyons si les phénomènes indiqués dans l'exemple précité peuvent nous expliquer l'existence des *toxones* [1].

Si ce poison se composait de toxines et de toxones par parties égales, (I) + L_0 serait composé de : 100 toxine-antitoxine + 100 toxone-antitoxine [2].

Qu'obtiendra-t-on en ajoutant à ce mélange complètement neutre un équivalent de toxine, ou plutôt une dose mortelle composée d'un équivalent de toxine et d'un équivalent de toxone?

Le résultat sera, dans ce cas, le même que celui qu'on obtiendrait en ajoutant un acide plus fort à un sel formé par un acide plus faible. La toxine, possédant une affinité plus forte pour l'antitoxine que la toxone, mettra cette dernière en liberté et se fixera elle-même à l'antitoxine devenue libre. — On aura donc :

101 toxine-antitoxine + 99 toxone-antitoxine
+ 1 toxone libre (dégagée)
+ 1 toxone libre (ajoutée).

Tant qu'il y aura, dans la combinaison, de l'antitoxine fixée à la toxone, la toxine ajoutée se substituera à cette dernière et sera fixée elle-même.

Quand toute la toxone sera mise en liberté on aura :

100 toxine-antitoxine (toxine d'origine).
100 — — (toxine ajoutée).
100 toxones (dégagées).
100 — (ajoutées).

Et ce n'est qu'en ajoutant à ce mélange encore 1 toxine-équ. qu'on aura (I) + $L_{\dagger}$, où (I) + $L_{\dagger}$ = 200 toxines-antitoxines + 1 toxine libre + 201 toxones libres.

En supposant qu'un poison contient un nombre égal d'équivalents de toxine et de toxone, le phénomène indiqué précédemment s'expliquerait donc très bien. Les mélanges intermédiaires

1. Il sera expliqué plus tard pourquoi M. Ehrlich a substitué le nom de *toxone* à celui d'*épitoxoïde*.

2. C'est-à-dire 100 toxine-équ. fixés à l'antitoxine et 100 toxone-équ. fixés à l'antitoxine.

entre 100 t. + I et 201 t. + I ne sont pas neutres. Ils sont actifs en ce sens que leur injection produit des œdèmes d'autant plus graves que la proportion de toxine est plus grande — mais il faut arriver au mélange de 201 t. + I pour tuer l'animal en moins de 5 jours.

En analysant une série de poisons diphtériques à l'état frais et ensuite à différents moments de leur conservation, on trouve que la quantité de liquide toxique neutralisé par (I) restera toujours la même malgré l'affaiblissement progressif du pouvoir toxique de ce liquide. Ainsi, si par exemple 0,01 de sérum neutralisait 100 doses mortelles d'un poison contenues dans 1 c.c. de bouillon toxique, la même quantité, c'est-à-dire 0,01 c.c. de sérum, ne pourra toujours neutraliser que 1 c. c. de ce bouillon toxique, bien que ce 1 c.c. de ce bouillon ne contienne successivement, à la suite de l'affaiblissement de la toxine, que par exemple 50 ou 33 doses mortelles.

On a pu suivre cet affaiblissement progressif pour un certain nombre de poisons diphtériques, et on a constaté que leur toxicité baisse de moitié ou d'un tiers, *tandis qu'ils fixent toujours la même quantité d'antitoxine*

En examinant une série de poisons frais, ou conservés, M. Ehrlich a obtenu les nombres suivants :

33		47,5	Moyenne 50,9
32		54,4	
33,2	Moyenne 33,4		
33,4			
35,7			

Eu égard aux difficultés que présentent ces recherches, on peut représenter, tout en restant dans les limites de l'exactitude, les nombres trouvés par l'expérience, par les nombres 1/3 et 1/2 par rapport à 100.

Or, comme on a constaté avec certitude :

1° Que les poisons peuvent s'affaiblir beaucoup et cela en proportions simples ;

2° Que leur pouvoir de fixer l'antitoxine est resté constant ;

3° Que dans beaucoup de cas 1 (I) fixe une quantité de poison représentant 100 (T),

On est amené à admettre que les deux moyennes : 33, et 50, trouvées ne sont pas l'effet d'un simple hasard, mais résul-

tent du fait que les L_0 des poisons en question contenaient à l'origine 100 (T), mais se sont *différenciés plus tard suivant des proportions simples* (1 : 3 ou 1 : 2).

En déterminant le pouvoir antitoxique de son sérum étalon, M. Ehrlich s'est servi d'un poison qui était composé exactement de parties égales de toxine et de toxone; 100 doses mortelles de ce poison contenaient donc 100 équ. de toxine et 100 équ. de toxone. La quantité de sérum, qui neutralisait 100 doses mortelles, fixait donc en réalité 200 équivalents du poison. Il en a conclu que le pouvoir fixateur de *son unité immunisante* était en réalité de 200, et que cette unité immunisante fixerait toujours 200 équivalents de tous les poisons, quel que soit leur teneur en toxine, toxones et toxoïdes.

Les expériences sur les effets produits par des mélanges de poison et d'antitoxine partiellement saturés, et dont les résultats seront exposés plus loin, s'accordent parfaitement avec cette hypothèse.

Nous admettons donc le nombre 200 comme l'expression du pouvoir d'attraction de (I).

En désignant par α le nombre des toxine-équivalents, et par z le nombre des toxone-équivalents contenus dans L_0 d'un poison déterminé, la composition de L_0 peut être alors écrite de la façon suivante :

$$L_0 = (200 - \alpha - z) \text{ toxoïde} + \alpha \text{ toxine} + z \text{ toxone} = 200 \text{ équivalents.}$$

En ajoutant (I) on aura :

$$(I) + L_0 = (200 - \alpha - z) \text{ toxoïde-antitoxine} + \alpha \text{ toxine-antitoxine} + z \text{ toxone-antitoxine.}$$

Quelles sont celles de ces valeurs qui peuvent être trouvées par l'expérience?

1. On obtient α en divisant simplement la valeur L_0 par la dose minima mortelle, on aura donc $\alpha = \frac{L_0}{(T)}$.

2. Un simple raisonnement nous permettra de déterminer z de la façon suivante : Pour mettre en liberté un toxone-équ. de sa combinaison avec l'antitoxine, il faut ajouter au composé un équivalent d'une substance dont l'affinité pour l'antitoxine est plus grande que celle de la toxone. Cet équivalent peut donc être de la toxine ou du toxoïde, ou un mélange des deux.

En désignant ce mélange dans l'équation suivante par : (toxoïde-toxine), L_0 s'écrira simplement :

$$L_0 = (200 - z)\ (\text{toxoïde-toxine}) + z\ \text{toxone}.$$

Donc, puisque dans L_0, nous avons 200-z équivalents de plus grande affinité, dont α toxine-équ., il faudra, pour mettre un toxone-équ. en liberté, ajouter à L_0 $\frac{1}{200\text{-}z} L_0$, dont $\frac{1}{200\text{-}z} \cdot \alpha$ toxine-équ.

Pour mettre z toxone-équ. en liberté, il faut ajouter, à L_0, $\frac{z}{200\text{-}z} L_0$, dont $\frac{z}{200\text{-}z}$ α toxine-équ.

L'expérience ne peut nous indiquer que la quantité de toxine-équ. contenue dans L_0 et comme (200-z) (toxoïde-toxine) contient α toxine-équ., on trouve par l'expression $\frac{z}{200\text{-}z}$ α dans L_0, le nombre des toxine-équ. qu'il faut ajouter à (I) + L_0 pour mettre en liberté z équivalents de toxone.

Antérieurement, on déterminait la même valeur d'une autre façon. On a constaté qu'il fallait ajouter à (I) + L_0, pour le transformer en (I) + L_+, autant d'équivalents de plus grande affinité qu'il y avait dans L_0, d'équivalents de toxone, et, en outre, un équivalent de toxine libre (pour que le mélange puisse en contenir une dose mortelle). Cette quantité de toxone-équ. était indiquée par la différence entre L_+ et L_0 moins 1,(D-1). En appelant cette quantité β,

$$\text{On avait :}\quad \beta = \frac{z}{200 - z}\,\alpha$$

$$\text{et } z = \frac{200\,\beta}{\alpha + \beta}$$

L'exactitude de ces rapports est confirmée par les recherches qui suivent.

En employant cette formule pour calculer les quantités de toxone-équ. contenues dans différents poisons, on trouve :

$$25,\ 33^{33},\ 50,\ 66^{67},\ \text{et } 100$$

Ces nombres se trouvent encore en proportions simples par rapport au nombre 200, de sorte qu'en déterminant les quantités des *toxone-équ.* dans L_0, on retrouve les mêmes lois de différen-

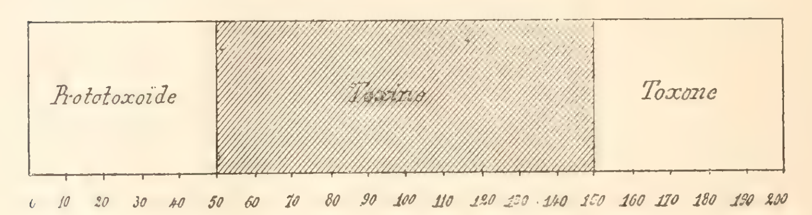
tiation qu'en déterminant, ainsi que nous l'avons vu plus haut, les quantités des *toxine-équ*.

Les recherches qui précèdent ne nous permettent de faire qu'une analyse qualitative du poison diphtérique.

Pour obtenir des renseignements plus précis sur sa constitution, il faut avoir recours à une *saturation partielle du poison par l'antitoxine*.

M. Ehrlich représente les résultats obtenus par des courbes qu'il construit de la façon suivante : sur l'axe des abscisses, divisé en 200 parties égales qui représentent les 200 équivalents du poison, il distribue ce poison de gauche à droite, de façon à placer à gauche, les équivalents possédant la plus grande affinité, les prototoxoïdes; et à droite, ceux qui possèdent la plus petite affinité, c'est-à-dire les toxones.

L_0 d'un poison composé, par exemple de 50 prototoxoïdes équ., 100 toxine équ. et 50 toxone équ. serait représenté par la figure suivante : (fig. 1)



En ajoutant (I) à cette valeur L_0, tous les équivalents du poison seront liés et le mélange sera tout à fait neutre.

$L_0 + \frac{200}{200}$ (I) ne pourra ni tuer un cobaye ni provoquer aucun symptôme pathogène.

En combinant, avec L_0, $\frac{199}{200}$ (I) au lieu de $\frac{200}{200}$ (I), un équivalent du poison ne sera pas lié, et naturellement ce sera celui dont l'affinité est la plus faible, c'est-à-dire un toxone-équ. D'après ce que nous avons vu plus haut, les toxones ne peuvent produire que des œdèmes, elles ne peuvent pas tuer. En ajoutant à L_0 des fractions de plus en plus petites de (I) nous aurons :

$$L_0 + \frac{198}{200} \text{ (I) tue 0 cobaye.}$$

$$L_0 + \frac{197}{200} (I) \quad — \quad 0 \quad —$$

et ainsi de suite, jusqu'au moment où tous les toxone-équ. seront mis en liberté, le mélange ne contiendra pas une seule dose mortelle, ainsi :

$$L_0 + \frac{150}{200} \text{ tue 0 cobaye.}$$

En n'ajoutant que $\frac{149}{200}$ (I) à L_0, on mettra en liberté un toxine-équ. et alors le mélange contiendra une dose mortelle.

$$L_0 + \frac{149}{200} (I) \text{ tue } 1 \text{ cobaye.}$$
$$L_0 + \frac{148}{200} (I) \quad — \quad 2 \text{ cobayes.}$$
$$L_0 + \frac{147}{200} (I) \quad — \quad 3 \quad —$$
$$L_0 + \frac{100}{200} (I) \quad — \quad 50 \quad —$$
$$L_0 + \frac{70}{200} (I) \quad — \quad 80 \quad —$$
$$L_0 + \frac{50}{200} (I) \quad — \quad 100 \quad —$$

Pour chaque $\frac{1}{200}$ (I), il y aura donc 1 toxine-équ. mis en liberté, de sorte qu'en n'ajoutant à L_0 que $\frac{50}{200}$ (I), il y aura, libres, 100 T, qui tueront 100 cobayes.

Maintenant tous les 100 toxine-équ. qui se trouvaient dans L_0 sont libres, de sorte qu'en diminuant encore la quantité d'antitoxine à ajouter à L_0, on n'obtiendra plus de toxine-équ.

$$L_0 + \frac{50}{200} (I) \text{ tue } 100 \text{ cobayes.}$$
$$L_0 + \frac{49}{200} (I) \quad — \quad 100 \quad —$$
$$L_0 + \frac{1}{200} (I) \quad — \quad 100 \quad —$$

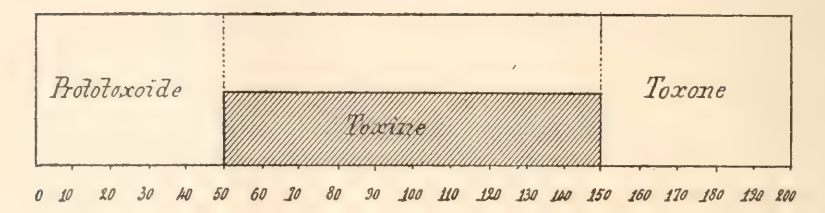
Même, en réduisant la quantité d'antitoxine à $\frac{1}{200}$ (I), on

n'obtiendra que 100 toxine-équ. libres, ce qui prouve qu'on se trouve de nouveau dans une zone non toxique, mais contenant cette fois des équivalents à affinité plus grande et se trouvant, par conséquent, à l'opposé de la zone des toxones.

On aura donc :

200 équ. toxine	+	200 équ. antitoxine	=	0	doses mortelles.
200 — —	+	150 — —	=	0	—
200 — —	+	50 — —	=	100	—
200 — —	+	0 — —	=	100	—

Le diagramme qui suit représenterait le même poison après un affaiblissement supposé de moitié. Le poison se serait différencié par dichotomie. L_0 ne contiendrait alors que 50 toxine-équ.



En examinant ce poison comme le premier, c'est-à-dire en le saturant partiellement avec l'antitoxine, on obtiendrait pour les toxones le même résultat qu'auparavant :

$L_0 + \frac{200}{200}$ (I) tue 0 cobayes.

— $+ \frac{150}{200}$ — — 0 —

— $+ \frac{149}{200}$ — — 0 —

— $+ \frac{148}{200}$ — — 1 —

— $+ \frac{147}{200}$ — — 1 —

— $+ \frac{146}{200}$ — — 2 —

— $+ \frac{145}{200}$ — — 2 —

— $+ \frac{144}{200}$ — — 3 —

— $+ \frac{140}{200}$ — — 5 —

— $+ \frac{100}{200}$ — — 25 —

$— + \frac{50}{200}$ — — 50 —

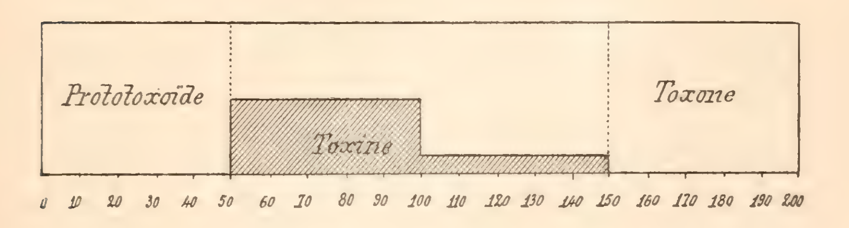
$— — \frac{1}{200}$ — — 50 —

Il est à remarquer pourtant que le premier équivalent de toxine ne devient pas libre quand on ajoutera $\frac{149}{200}$ (I) à L_0, comme dans le premier cas ; mais seulement quand on n'aura ajouté que $\frac{148}{200}$ (I), le second toxine-équ., quand on n'aura ajouté que $\frac{146}{200}$ (I), le troisième $\frac{144}{200}$ (I). et ainsi de suite. Pour mettre en liberté 1 toxine équ., il faut diminuer la quantité d'antitoxine à ajouter par $\frac{2}{200}$ (I) au lieu de $\frac{1}{200}$ (I), comme c'était le cas pour le poison non affaibli.

On peut en conclure que, dans la zone de la toxine, il y a pour chaque toxine-équ. encore un toxoïde-équ. d'égale affinité pour l'antitoxine, donc un *syntoxoïde-équ.*

Les prototoxoïdes montreront les mêmes relations que dans le premier cas.

En supposant un affaiblissement du poison tel que L_0 ne contiendrait plus que 30 (T), la toxine occuperait alors la position représentée dans la figure 3.



$L_0 + \frac{200}{200}$ (I) tue 0 cobaye.

$— + \frac{150}{200}$ — — 0 —

. . . .

$— + \frac{144}{200}$ — — 0 —

—	+	$\frac{140}{200}$	—	—	1	—
—	+	$\frac{130}{200}$	—	—	2	—
—	+	$\frac{120}{200}$	—	—	3	—
—	+	$\frac{100}{200}$	—	—	5	—
—	+	$\frac{99}{200}$	—	—	5	—
—	—	$\frac{98}{200}$	—	—	6	—
—	+	$\frac{97}{200}$	—	—	6	—
—	+	$\frac{96}{200}$	—	—	7	—
—	+	$\frac{90}{200}$	—	—	10	—
—	+	$\frac{50}{200}$	—	—	30	—
—	+	$\frac{1}{200}$	—	—	30	—

La zone des toxones n'a pas changé, mais dans la partie du diagramme qui s'étend de 150 à 100, il y a maintenant une telle distribution des toxines et des toxoïdes que pour chaque toxine-équ. il y a maintenant 9 toxoïde-équ.

Entre 100 et 50 on trouve la même distribution de toxine que dans la figure 2.

La zone des prototoxoïdes n'a pas changé.

Ces exemples nous montrent de quelle façon *la saturation partielle de la toxine par l'antitoxine* nous permet d'examiner les différentes zones du poison. Cette méthode nous donne surtout le moyen *d'isoler les toxones* et d'en étudier les effets séparément, sans l'influence des autres éléments *libres* du poison, et aussi de contrôler la justesse de la formule établie plus haut pour calculer les quantités des toxones. J'indiquerai bientôt l'application que j'ai faite de cette méthode à l'étude des quatre poisons dont j'ai parlé au commencement de cet article.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ

PROPRIÉTÉS DES MÉLANGES DES TOXINES AVEC LEURS ANTITOXINES

CONSTITUTION DES TOXINES

PAR

JEAN DANYSZ

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur.

En cherchant à déterminer, d'une façon plus exacte que cela n'a été possible jusqu'ici, les unités de mesure pour apprécier la valeur d'une antitoxine diphtérique, M. P. Ehrlich est arrivé à établir, par une longue série d'expériences, les faits résumés dans le mémoire précédent, et sur lesquels je ne reviendrai pas pour le moment[1].

Pour expliquer ces faits constatés par l'expérience, M. Ehrlich admet que le poison diphtérique est un composé de trois substances, de virulence très inégale pour les animaux, mais d'affinité équivalente pour l'antitoxine ; il admet, en outre, que l'*avidité* avec laquelle ces trois substances se fixent sur l'antitoxine n'est pas la même. Réservant le nom de *toxine* à la substance la plus virulente et d'une avidité moyenne, il appelle *toxoïde* celle qui n'a aucune virulence et possède le plus d'avidité pour l'antitoxine, et *toxone* celle qui a une virulence beaucoup plus faible, qui diffère

1. Pour faciliter la lecture de cette note, j'emploierai les mêmes abréviations que celles employées par Madsen dans le travail qui paraît dans le même fascicule des *Annales*.

T. Unité toxique ou 1 dose de toxine mortelle en 4 jours pour cobaye de 250 grammes.

I. Unité immunisante : quantité d'antitoxine qui neutralise 100 T d'une toxine qui a servi à établir le premier « étalon » d'antitoxine.

L_0 (limite de neutralité) quantité de toxine neutralisée par I.

L_+ (limite d'action d'une dose mortelle) quantité de toxine qui, mélangée à I, laissera exactement 1 T libre.

dans ses effets de la toxine, et qui a le moins d'avidité pour l'antitoxine.

On peut se faire une idée très exacte de cette constitution du poison diphérique imaginée par M. Ehrlich en se représentant un poison composé par exemple d'un mélange de chlore, de brome et d'iode en proportions variables, par exemple, 75 chlore, 100 brome et 25 iode, et dans lequel le brome aurait les propriétés de la toxine, le chlore serait le toxoïde, et l'iode, la toxone. En prenant le potassium comme antitoxine de ce poison, et en admettant que 1 c. c. de ce poison contient 100 doses mortelles, c'est-à-dire 100 éq. de brome, on verrait tout d'abord que, pour neutraliser complètement 1 c. c. du liquide toxique, c'est-à-dire satisfaire toutes les affinités, il faudrait non pas 100 K, mais 200 K, et ensuite que :

1) si T = 0,01 c. c. du poison

L_{+} serait = 115,3 T ou 1,153 c. c. du poison.

L_0 » = 100 T ou 1 c. c. —

D = 15,3 T ou 15,3 doses mortelles.

il faudrait donc ajouter 15 doses mortelles au mélange neutre pour obtenir une dose mortelle libre. Le brome du mélange ajouté a commencé en effet par se fixer sur le K du KI et il n'y avait de brome libre dans le mélange qu'après déplacement de tous les équivalents d'iode de sa combinaison;

2) Que, si on ajoutait 75 K à 1 c. c. du poison, ce mélange contiendrait exactement 100 doses mortelles, puisque les 75 K seraient complètement absorbés par les 75 Cl.

Il y aurait donc, d'une part, disparition apparente d'une partie de la toxine, d'autre part, disparition d'une partie de l'antitoxine contenues dans les mélanges.

3) La différence *D* entre les valeurs L_0 et L_{+} contient D — 1 de toxone et 1 de toxine.

La valeur D — 1 ou β doit être nécessairement directement proportionnelle à la quantité de toxone, et inversement proportionnelle à la quantité de toxine contenue dans L_0 ce qui, lorqu'on connaît la quantité de toxine (dose mortelle), permet de calculer la quantité de toxone et de toxoïde, ou, en d'autres termes, de faire une analyse quantitative de chaque poison dans toutes les phases de ses transformations ou affaiblissements à l'aide de la formule

$z = \frac{200\,\beta}{\alpha + \beta}$, dans laquelle z représente la toxone, α la toxine et 200 le nombre d'équivalents de poison pouvant être fixés par les 200 équivalents de l'unité immunisante.

D'après Ehrlich, la constance de la valeur de β pour un poison, quel que soit le degré d'affaiblissement de ce poison, par rapport à un sérum antitoxique dont la valeur a été déterminée par une toxine quelconque, donne une unité de mesure constante et rend comparables toutes les déterminations des toxines et d'antitoxines inconnues, ainsi que toutes les études sur l'immunité antitoxique[1].

Mais, si la constatation de cette série de faits, confirmés par les expériences de Madsen que publieront bientôt ces « Annales », et leur réunion dans un ensemble bien coordonné, marque un progrès considérable dans nos connaissances de ce que l'on peut appeler « l'action des toxines », la tentative de M. Ehrlich d'expliquer les causes et la nature des phénomènes qu'il a si bien su observer et démêler, est moins heureuse.

Pour expliquer la présence dans les poisons diphtériques de ses *toxones* et *toxoïdes*, M. Ehrlich a admis tout d'abord que les molécules du poison qui, au début de leur formation, étaient équivalentes sous tous les rapports, étant toutes des molécules de *toxine*, se transformaient peu à peu en substances ayant des propriétés différentes. Ayant reconnu plus tard que la *toxone* se formait toujours en même temps que la *toxine*, qu'elle était contenue souvent en quantité égale à celle de la toxine dans le bouillons de culture, et que cette quantité n'augmentait jamais après filtration de la culture ou destruction des microbes, il a été obligé d'admettre que la *toxone* était une substance active différente de la *toxine*, et qu'elle était secrétée par les microbes diphtériques en même temps que cette dernière.

Comme, au contraire, la quantité de *toxoïde* augmente toujours dans la même proportion que diminue la quantité de toxine, M. Ehrlich a été confirmé dans l'idée que la toxoïde est un produit de transformation de la toxine.

1. Cette « unité de mesure » adoptée par M. Ehrlich n'est probablement pas juste, il sera impossible de faire une mesure juste aussi longtemps qu'on n'aura pas de toxines pures; mais en corrigeant la « mesure » on pourra aussi corriger toutes les évaluations antérieures, de sorte que les résultats de toutes les expériences seront toujours comparables.

Cette transformation de la toxine et de la toxone en toxoïdes et toxonoïdes se ferait d'une façon très simple : ces poisons seraient formés de deux substances distinctes, dont l'une, *toxophore*, serait le principe actif du poison, et dont l'autre, *haptophore*, n'aurait que la propriété de fixer le principe actif sur les éléments sensibles. Une molécule de toxine se transformerait donc en toxoïde, en perdant le groupement *toxophore* qui y était attaché à l'origine.

La substance toxophore n'aurait aucune affinité ni pour les éléments sensibles qu'elle tue, ni pour l'antitoxine. Seule, la substance toxophore serait complètement neutre, et ne pourrait agir que par l'intermédiaire de la substance *haptophore* qui, par contre, serait doublement active, et posséderait la prppriété, assez singulière, de fixer d'un côté exclusivement le principe actif pour former un produit actif, et d'un autre côté exclusivement la substance sensible ou l'antitoxine, pour former un produit neutre.

Ce serait, en quelque sorte, un *noyau d'affinité* avec une *affinité gauche*, exclusivement réservée à l'antitoxine, et une *affinité droite*, spécialement réservée à la toxine.

Un poison affaibli serait donc, pour M. Ehrlich, un poison dont un certain nombre de *noyaux* auraient perdu leur groupement toxique ; ou, ce qui reviendrait au même, leur affinité pour la toxine, tout en gardant intacte leur affinité pour l'antitoxine.

Une molécule de poison saturée pourrait être représentée le plus simplement par : $a - N - t$, où N serait le noyau d'affinité, a l'antitoxine et t le principe actif.

On aurait ainsi :

$$- N^{100} - t^{100} = 100 \text{ doses mortelles.}$$

$$a^{100} - N^{100} - t^{100} = \text{mélange neutre.}$$

$$- N^{100} - t^{50} = 50 \text{ doses mortelles.}$$

$$a^{50} - N^{100} - t^{50} \text{ ou } \left\{ \begin{array}{l} - N^{50} - t^{50} \\ a^{50} - N^{50} - \end{array} \right. = 50 \text{ doses mortelles.}$$

$$a^{100} - N^{100} - t^{50} \text{ ou } \left\{ \begin{array}{l} a^{50} - N^{50} - t^{50} \\ a^{50} - N^{50} - \end{array} \right. = \text{mélange neutre.}$$

Dans ses expériences sur l'action des *lysines*, M. Ehrlich croit être parvenu à séparer la substance haptophore de la substance toxophore.

Je crois devoir citer en entier une de ses nombreuses et intéressantes expériences, parce qu'elle les résume en quelque

sorte toutes, et parce qu'elle nous montre, en même temps, combien est artificiel tout ce système de distinctions basé uniquement sur un ensemble de phénomènes produits par des substances dont on ne connaît ni la nature, ni le mécanisme d'action.

En exposant un mélange de hémolysine (Immunkörper et Adiment) et de sang sensible à une température voisine de 0°, en centrifugeant, et en séparant ensuite, par décantation, le dépôt du liquide qui surnage et en ajoutant :

1° Au dépôt :

a) De l'eau physiologique, M. Ehrlich n'obtient : aucune réaction.

b) De l'eau physiologique et du sérum normal, il obtient : hémolyse.

2° Au liquide décanté :

a) Des hématies sensibles, il n'obtient : aucune réaction.

b) Des hématies et du sérum normal, il n'obtient : aucune réaction.

c) Des hématies et de l'hémolysine chauffée, obtient : hémolyse.

Il en conclut : 1° que, puisque à une température voisine de 0°, le *noyau d'affinité* (Immunkörper) se fixe seul sur les hématies, tandis que le *principe actif* (Adiment) reste dans le liquide ; *ce sont là deux substances distinctes et séparables ;* 2° que, puisque le noyau et le principe actif agissant séparément restent neutres pour les hématies sensibles, et puisque le noyau seul possède de l'affinité pour les hématies, *le principe actif ne peut agir que par l'intermédiaire de son noyau d'affinité et quand il y est attaché.*

Il semble donc bien qu'il y a là dans cette hémolysine deux substances, l'une hapto, l'autre toxophore, séparables, et ne pouvant agir que quand elles sont fixées l'une à l'autre; mais une simple réflexion nous montre que le phénomène n'est pas aussi simple que semble l'admettre M. Ehrlich.

Si, en effet, les deux substances ont de l'affinité l'une pour l'autre, elles doivent se trouver à l'état de combinaison dans les mélanges dans lesquels elles se trouvent ensemble. Pourquoi alors l'une d'elles, la substance haptophore, se fixerait-elle seule sur les hématies, laissant l'autre dans le liquide ?

Il ne suffit pas, pour expliquer ce fait, d'admettre, ainsi que

le fait M. Ehrlich, des différences d'affinité du noyau pour les hématies d'une part et pour le principe actif d'autre part. Il faudrait admettre, en outre, que les deux substances peuvent se combiner et se décomposer pour ainsi dire spontanément, sans causes apparentes, ce qui, à notre avis, est loin d'être impossible; mais ce qui nous conduirait en même temps à une interprétation de tous ces phénomènes foncièrement différente de celle professée par M. Ehrlich.

Nous réservant de revenir plus loin avec plus de détails sur le mécanisme de l'action de ces deux substances qui constituent tout poison immunisant, il nous faut examiner encore maintenant le rôle que, d'après les idées de M. Ehrlich, les substances hapto et toxophore devraient jouer dans le processus de l'immunisation.

Nous avons vu plus haut qu'une toxine ne peut agir que par l'intermédiaire de son noyau; si donc un *noyau* venait s'attacher par son « affinité gauche » à une cellule sensible, tenant en même temps le principe actif attaché à son « affinité droite », il serait neutralisé par une chaîne latérale de la cellule et mettrait cette cellule « sous l'influence » (?) du principe actif. Ce dernier agirait alors sur la cellule et produirait des lésions qui se traduiraient par des symptômes caractéristiques pour chaque toxine.

Si, au contraire, le *noyau* était seul, il neutraliserait tout aussi bien la même « chaîne latérale », mais, dans ce cas, la cellule ne s'en porterait pas plus mal. Il n'y aurait pas de symptômes caractéristiques et, par conséquent, pas de lésions spécifiques, mais l'action de ce *noyau* n'en serait pas moins spécifique pour chaque toxine.

La conclusion que l'on est nécessairement amené à en tirer, *c'est que ce ne serait pas le principe actif, mais le noyau qui jouerait le rôle principal, sinon exclusif, dans l'action immunisante des toxines.*

En effet, en admettant avec M. Ehrlich, que l'antitoxine ne serait autre chose que la « chaîne latérale » qui fixe le noyau de la toxine sur la cellule sensible et qui serait produite en excès, et versée dans la circulation à la suite d'une reproduction surabondante des « chaînes latérales » neutralisées par le poison, on serait aussi obligé d'admettre que c'est la substance haptophore

seule qui pourrait jouer un rôle actif dans la production de l'antitoxine; et cela, parce que, seule, la substance haptophore possède une affinité pour ces chaînes latérales et peut les neutraliser; et ensuite, parce qu'une cellule tuée ou endommagée par la substance toxophore serait certainement incapable de reproduire quoi que ce soit.

Je crois devoir insister tout spécialement sur le rôle prépondérant que M. Ehrlich attribue à la substance haptophore dans le processus de l'immunisation. C'est là, en effet, la base fondamentale de ses théories sur la constitution et sur l'action des toxines, théories qui indiquent une direction nouvelle aux recherches sur l'immunité et délimitent en même temps le champ de ces recherches.

D'une part, M. Ehrlich cherche à préciser la nature de la constitution des substances actives sans pouvoir donner à cette constitution aucune image nette d'une structure moléculaire quelconque et sans lui trouver d'analogues connus; d'autre part, il cherche à préciser la nature des réactions entre les substances actives et les substances sensibles en admettant que ces réactions aboutissent toujours à la formation d'un produit neutre identique à un sel neutre résultant d'une combinaison d'un acide et d'une base.

On peut dire, en un mot, que, si le travail expérimental de M. Ehrlich et de ses élèves apporte une série de faits nouveaux d'un très grand intérêt, l'ensemble de ses considérations théoriques contient trop d'incertitudes et d'idées vagues enserrées dans des limites trop étroites, pour satisfaire l'esprit.

La première obligation que doit s'imposer un expérimentateur quand il veut interpréter une série de phénomènes qui varient suivant que changent les conditions de l'expérience, c'est de tenir compte de tous les facteurs qui ont pu influer sur les changements observés. Cette obligation n'est pas toujours facile à remplir; mais il est certain que si, — ayant à opérer dans un milieu compliqué, — on se bornait à baser ses conclusions sur les changements apparents que montre la substance étudiée, sans tenir compte des changements de nature et de proportion que subissent en même temps toutes les autres substances qui

composent le milieu, on aurait toutes les chances d'arriver à des conclusions fausses ou tout au moins gratuites.

C'est précisément dans ces conditions défectueuses que M. Ehrlich explique les modifications que subissent les toxines, en considérant ces dernières comme des substances bien définies quant à leurs propriétés, et en négligeant complètement le milieu dans lequel elles se trouvent; en admettant, en un mot, que les toxines subiraient les mêmes modifications si elles se trouvaient à l'état pur dans de l'eau distillée.

Or, il est évident que si une toxine forte, diluée dans l'eau distillée, n'a pas exactement les mêmes propriétés, la même « allure d'action », qu'une toxine affaiblie au même titre, — ainsi que cela est facile à constater, — il faut tenir compte, pour expliquer ce changement de propriétés, non seulement des modifications intimes que la substance toxique a pu subir par elle-même, mais aussi de la différence des proportions de toutes les autres substances contenues dans les deux liquides. Ainsi, en appelant *m* la somme de toutes les substances, autres que la toxine, contenues dans un bouillon de culture, T l'unité de toxine contenue dans ce bouillon et en exprimant par $\frac{m}{T}$ le rapport de ces deux sortes de substances dans un bouillon toxique frais, il faut au moins tenir compte de ce fait que, si 1 c. c. de bouillon toxique contient 100 T p. ex., on aura : 1) $\frac{m}{100\,T}$ dans 1 c. c. de bouillon toxique frais, 2) $\frac{m}{T}$ dans 1 c. c. du même liquide après affaissement de la toxine de 100 à 1, et 3) $\frac{m\ 100}{T}$ dans 1 c. c. du liquide frais dilué à 1/100 dans l'eau distillée.

J'ai eu déjà l'occasion de signaler[1] l'importance des changements de ce rapport $\frac{m}{T}$ sur les effets produits par les diastases d'un sérum actif sur un sang sensible.

Les expériences citées dans cette note m'ont permis de constater :

1° Que si en appelant *m* l'ensemble de substances en solution ou en suspension dans un volume déterminé d'eau distillée — dans certaines conditions du rapport $\frac{m}{T}$ un sérum actif donnait avec un sang sensible une *hémolyse*, on obtenait, en augmentant ou en diminuant la valeur de *m* par rapport à celle de T,

1. *Bulletin de la Soc. de Biologie*, 30 juin 1899.

tantôt une *agglutination*, tantôt une *coagulation* séparément, tantôt les trois phénomènes ensemble ;

2° Que l'apparition de ces trois phénomènes dépendait de la proportion des sels (chlorure de sodium et citrate de soude) par rapport à la quantité de sang, ce que l'on peut exprimer, en remplaçant m par sa valeur $n + s$ (n indiquant la quantité de sels et s la quantité de sang) par le rapport $\frac{n+s}{T}$.

Des expériences ultérieures m'ont permis de constater, en outre :

3° Qu'une certaine quantité (très faible) de phosphates pouvait modifier très sensiblement l'intensité de ces trois phénomènes, favorisant l'un d'eux, empêchant l'autre, suivant les proportions et la nature de ces phosphates ajoutés au mélange $\left(\frac{(p+n)+s}{T}\right)$.

Ces expériences m'ont permis, en un mot, de constater d'une façon tangible :

Qu'une seule substance active peut produire des phénomènes différents, non pas seulement parce qu'elle est composée dès l'origine de plusieurs substances distinctes (toxine et toxone), *ou parce qu'elle serait composée de plusieurs substances résultant d'une différenciation* (toxoïdes et toxonoïdes d'Ehrlich) *d'une seule substance, uniforme à l'origine, mais simplement par suite du changement du rapport* $\frac{m}{T}$.

Une dissection plus détaillée de ces phénomènes consisterait à déterminer avec une précision suffisante le rôle de chaque composant du milieu dans lequel on fait agir la substance active, c'est-à-dire l'influence de la quantité et de la nature des valeurs p, n, s par rapport à la quantité de T, et le rôle des substances qui composent T. Mais comme, quand il s'agit de toxines, T n'est pas non plus un corps simple, mais un composé complexe de substances plus ou moins inconnues, il est évident que, tant que nos connaissances resteront ce qu'elles sont actuellement au sujet de la composition chimique des toxines et des substances sensibles à l'action de ces toxines, tout progrès dans cette direction sera impossible.

Toutefois, ne pouvant pas aborder le problème de face, il sera peut-être possible de pénétrer un peu plus en avant dans les secrets de ces actions par un chemin détourné.

Je crois avoir trouvé ce chemin en créant de toutes pièces un T artificiel ; alors connaissant T, p et n, il ne reste plus qu'une seule inconnue : la substance sensible, dont on pourra peut-être

déterminer la composition en tâtonnant, par des analogies, s'il est impossible de le faire autrement.

Ma toxine c'est de l'ammoniaque, et ce sont les récents travaux sur les substances hémolysantes et surtout le travail de mon ami M. Madsen, sur l'action de la tétanolysine, travail qui n'est pas encore publié, mais dont Madsen a bien voulu me communiquer les résultats, — qui m'ont donné l'idée de comparer l'action des sérums hémolysants à l'action analogue de l'ammoniaque. Pour comparer les propriétés des mélanges des toxines avec leurs antitoxines, je me suis servi de mélanges d'ammoniaque et d'acide sulfurique.

Je puis déclarer de suite que les résultats obtenus ont complètement répondu à mes prévisions.

Après avoir déterminé les unités de mesure pour l'action d'une ammoniaque en solution dans de l'eau physiologique sur un sang déterminé, j'ai reconnu tout d'abord que ces unités de mesure restaient sensiblement les mêmes quand, au lieu de l'ammoniaque seule, on employait un mélange d'ammoniaque et d'acide sulfurique dans lequel il y avait les mêmes quantités d'ammoniaque libre que dans le cas précédent. Ainsi, si 0.0001 c.c. am. produisait une hémolyse à peine appréciable, 0.009 am. donnait une hémolyse complète, les mélanges de 0.0999 acide + 0.01 c.c. am., et 0.0001 d'acide c.c. + 0.009 am. donnaient exactement les mêmes résultats. Toutes les doses, dans les deux séries, agissaient exactement de la même façon, les deux courbes se couvraient exactement dans tous leurs points.

Il en était tout autrement quand, au lieu de diluer l'acide et l'ammoniaque dans l'eau, on faisait les mêmes dilutions dans un peu de sérum et d'un bouillon de culture. Dans ce cas si 0.001 d'ammoniaque seule donnait 1 unité, il fallait ajouter 10 unités d'ammoniaque, au mélange neutre pour la phénolphtaléine, pour obtenir sur le sang le même effet que celui produit par l'unité d'ammoniaque seule.

Enfin quand, au lieu de prendre du bouillon et du sérum, j'ai ajouté aux dilutions d'ammoniaque et d'acide sulfurique dans de l'eau physiologique, du phosphate de soude à la dose de 1 gr. par litre, en suivant en cela les conseils qu'a bien voulu me donner M. Duclaux, j'ai obtenu le même phénomène, mais

encore plus exagéré que dans le cas précédent. L'unité d'action de l'ammoniaque seule étant de 0.001 c. c., il fallait ajouter 20 unités d'ammoniaque au mélange neutre, pour obtenir le même effet.

En outre, si, au lieu de prendre du sang de lapin, comme dans les expériences précédentes, on traite le sang d'oie de la même façon, on obtient les mêmes résultats généraux, mais le nombre d'unités d'ammoniaque (unités toxiques) qu'il faut ajouter à un mélange neutre pour obtenir le même effet que celui produit par l'unité d'ammoniaque seule, est de 40 quand la proportion de phosphate de soude est de 1/000 et de 70 quand cette proportion est portée à 2/000.

En exprimant ces résultats par la formule d'Ehrlich, nous aurions, en prenant comme unité de mesure 1 c. c. de liquide ammoniacal contenant 100 T :

Dans le 1er cas	....	$L_0 = 100$ T
— 2e —	....	$L_0 = 90$ T
— 3e —	....	$L_0 = 80$ T
— 4e —	....	$L_0 = 60$ T
— 5e —	....	$L_0 = 30$ T

La même ammoniaque nous apparaîtrait donc dans ces 5 cas comme 5 ammoniaques différentes composées de deux substances différentes en proportions variables, substances qui auraient des toxicités et des avidités différentes, mais des affinités équivalentes pour l'acide.

L'analogie entre les propriétés de la toxine diphtérique découvertes par M. Ehrlich et l'influence des phosphates sur l'action de l'ammoniaque ne s'arrête pas là : en ajoutant à des séries de tubes convenablement disposés, et contenant tous les mêmes quantités de sang, des doses croissantes par exemple de 1 à 50 ou 100 unités d'ammoniaque seule et d'ammoniaque partiellement saturée par l'acide sulfurique, et préparées comme il est indiqué dans les 5 cas précédemment cités, et en indiquant les différences d'effets produits par des courbes, on constate que :

1° Pour l'ammoniaque seule, les effets produits sont régulièrement proportionnels aux doses employées. La ligne par laquelle on réunit les points qui marquent les effets produits dans chaque tube est une droite allant de 0 à 100 par exemple.

2° Pour l'ammoniaque en excès dans un mélange d'ammoniaque et d'acide en dilution dans du bouillon ou dans l'eau contenant du phosphate de soude en proportions variables, les effets produits ne sont pas régulièrement proportionnels aux doses employées. En réunissant les points qui marquent les effets produits par les mélanges par rapport aux effets produits par l'ammoniaque seule, on obtient une ligne brisée, montant en escalier et qui rejoint ou dépasse même la précédente en différents points.

Pour chaque proportion d'ammoniaque, d'acide et de phosphate, il y aurait donc une loi d'action différente.

La courbe que l'on obtient peut être divisée en zones dans lesquelles l'action de doses croissantes d'ammoniaque serait neutralisée à partir d'un certain degré, et qui sont suivies de sauts brusques, — comme si l'ammoniaque se trouvait concentrée en certains points. — En disposant les tubes à essai contenant des doses croissantes d'ammoniaque de gauche à droite, on pourrait dire que l'ammoniaque, dont l'action disparaît à gauche, se concentre à droite.

Les deux courbes qui suivent donneront d'ailleurs une idée plus exacte de la marche de l'expérience que toutes les descriptions :

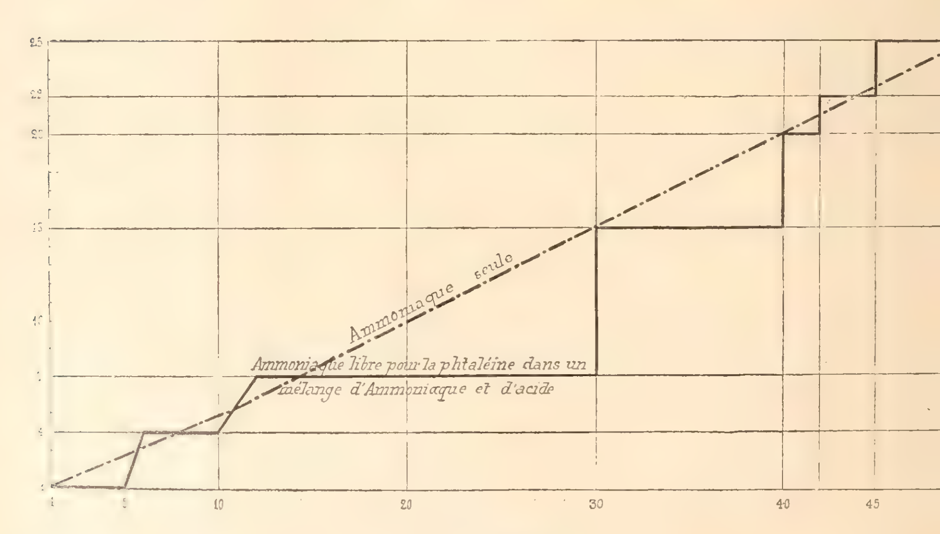


Fig. 1. Sang de lapin.

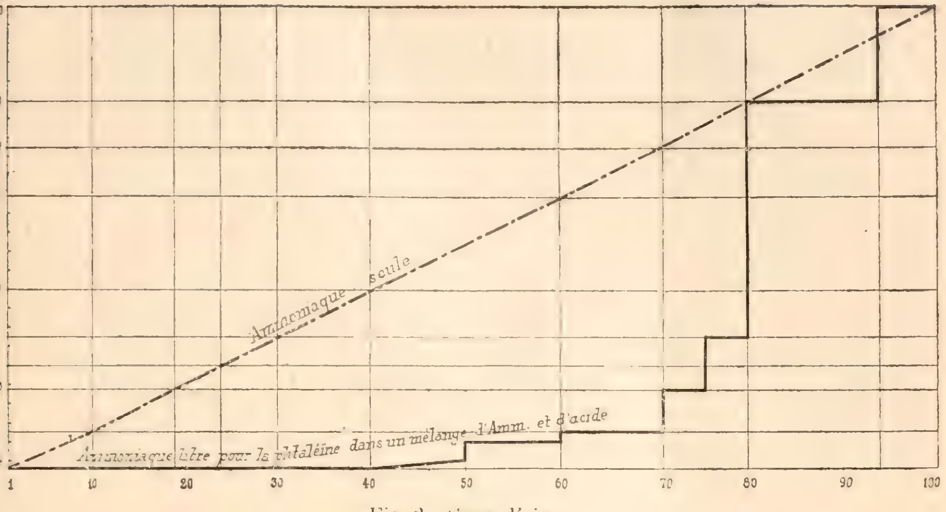


Fig. 2. Sang d'oie.

Dans les deux cas il a été employé des solutions d'ammoniaque et d'acide sulfurique dans l'eau physiologique contenant 1/000 de phosphate de soude. Les deux liquides se neutralisaient exactement à volumes égaux pour la phtaléine du phénol.

La fig. 1 (sang de lapin) indique que si 0,5 c. c. d'ammoniaque étaient exactement neutralisés par 0,5 c. c. d'acide pour la phtaléine, il fallait 0,5 d'am. + 0,45 d'acide pour obtenir un mélange neutre pour le sang, et que 0,5 c. c. d'ammoniaque seule produit le même effet qu'un mélange de 0,05 c. c. d'acide et de 0,5 c. c. d'ammoniaque.

La fig. 2 (sang d'oie) indique que, si 1 c. c. d'am. + 1 c. c. d'acide donnent un mélange neutre pour la phtaléine, il faut 1 c. c. d'am. + 0,60 c. c. d'acide pour obtenir un mélange neutre pour le sang d'oie et que, si 1 c. c. d'am. = 100 T, on a 1 c. c. d'am. + 0,05 c. c. d'acide, également = 100 T.

Il est évident que, dans ces deux cas, ce sont uniquement les changements de proportions dans les quantités de phosphate par rapport à la quantité d'ammoniaque libre qui a pu produire les différences d'action marquées par les deux courbes de chaque figure.

Il semble certain aussi que « l'allure spéciale » de l'action des mélanges de toxines et d'antitoxines diphtériques, observée par

M. Ehrlich, doit être attribuée aux mêmes causes. En effet, dans un mélange de $I + L_{\dagger}$ d'une toxine dont $L_{\dagger}$ serait de 101 T, on aurait 1 T libre pour 100 *m*. on aurait donc le rapport de $\frac{100\ m}{T}$ au lieu de $\frac{m}{T}$, comme ce serait le cas pour la toxine seule.

Cette influence du phosphate sur l'action très spéciale de l'ammoniaque nous donne encore quelques autres renseignements intéressants :

Ainsi, les courbes ci-dessus nous montrent qu'un mélange complètement neutre pour le sang d'oie est encore très actif pour le sang de lapin. D'autre part, nous avons remarqué plus haut que, en augmentant les proportions des phosphates dans les mélanges, on diminue l'action de l'ammoniaque sur le sang du même animal. C'est encore là une analogie frappante avec l'action de la toxine seule ou en mélange avec son antitoxine sur les animaux plus ou moins sensibles.

Cette analogie nous aidera peut-être à trancher d'une façon définitive la question encore controversée de la nature de la combinaison entre une toxine et son antitoxine quand elles se trouvent mélangées ensemble.

Il s'agit de savoir, en effet, si un mélange inactif de toxine et d'antitoxine peut être considéré comme un mélange chimiquement neutre, ou un mélange dans lequel les deux substances en quantités équivalentes s'empêcheraient d'agir mutuellement.

L'argument qui semblait le plus décisif en faveur de cette dernière opinion, c'est qu'un mélange inactif pour un animal peu sensible se montrait toujours actif pour un animal plus sensible. Eh bien! les résultats des expériences avec les mélanges d'acide et d'ammoniaque en présence des phosphates nous montrent que, s'il est possible et même très probable que la majeure partie de la toxine se combine avec l'antitoxine pour former un mélange chimiquement neutre, il n'en est pas moins certain que la quantité de toxine, dont l'action semble disparaître pour un animal peu sensible. mais qui apparaît dans un organisme plus sensible, n'*est pas chimiquement neutralisée.*

En effet, dans le cas de l'ammoniaque, on peut évaluer exactement en unités et en c. c. quelle est la quantité d'ammoniaque qui disparaît sous l'influence d'une quantité connue de phosphate, et on trouve que 1 de phosphate de soude fait disparaître dans certains cas 100, dans d'autres 200 et plus d'ammo-

niaque. Il ne peut donc en aucun cas s'agir là d'une réaction chimique proprement dite entre l'acide phosphorique et l'ammoniaque, parce que, en admettant que toute la soude du phosphate de soude puisse être remplacée par l'ammoniaque, cette dernière ne pourrait disparaître du mélange que dans la proportion de 1 de soude pour 2 de notre solution d'ammoniaque.

On peut donc dire que dans tous les milieux contenant des phosphates, il n'y a de neutralisation chimique que dans des limites variables suivant les proportions des phosphates dans les mélanges.

Enfin, je crois devoir faire remarquer que, dans le cas particulier de l'action des phosphates sur les mélanges d'ammoniaque et d'acide sulfurique, le phosphate peut être considéré comme une sorte de réactif d'une délicatesse très grande et très spéciale; et que, par conséquent, tout acide et toute base inorganique ou organique se trouveraient dans le même cas.

Or, comme il y a une analogie très étroite entre l'action, dans des milieux phosphatés, des acides et des bases d'une part, et l'action des toxines et des antitoxines d'autre part, n'est-on pas conduit à admettre que ce sont les phosphates précisément qui donnent à l'action de ces deux sortes de substances la même allure; et, en dernière analyse, que la toxine et l'antitoxine sont l'une pour l'autre un acide et et une base?

En résumé, il me semble démontré :

1° Que l'allure particulière de l'action des toxines, ainsi que les propriétés des mélanges de toxine et d'antitoxine précisées par M. Ehrlich, n'ont pas pour cause une différenciation de la toxine en substances différentes plus ou moins toxiques, mais tout simplement la présence des phosphates dans les mélanges en proportions plus ou moins fortes, suivant les degrés d'affaiblissement plus ou moins avancé des toxines;

2° Que, suivant les proportions des phosphates et d'autres sels contenus dans les mélanges (et dans les tissus, quand il s'agit de l'action d'une toxine sur un organisme vivant), une même substance active peut produire des effets variables. D'où différence de sensibilité et d'action d'une toxine sur les animaux de différentes espèces.

LA PESTE BOVINE EN TURQUIE

ÉPIDÉMIOLOGIE — FORMES CLINIQUES — SÉROTHÉRAPIE

PAR

LE Dr RÉFIK-BEY
Chef de laboratoire.

LE VÉTÉRINAIRE RÉFIK-BEY
Chef de laboratoire adjoint.

(Institut impérial de bactériologie de Constantinople.)

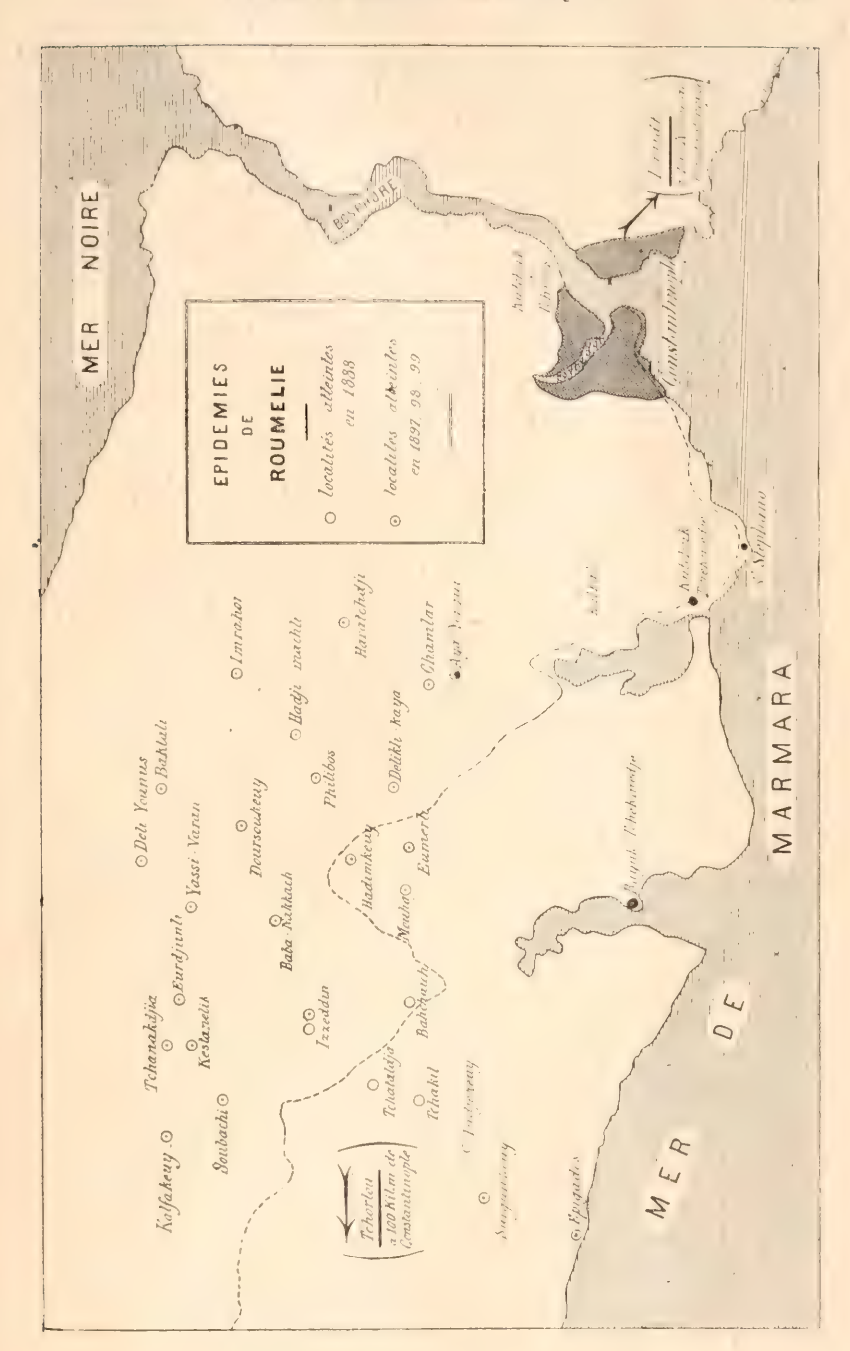
Depuis l'année 1897, nous avons été spécialement chargés par M. le Dr Nicolle de suivre diverses épidémies de peste bovine et de diriger l'application en grand du traitement sérothérapique. Le présent travail contient le résumé de nos recherches.

Inutile d'insister sur la fréquence de la peste bovine en Turquie, fréquence déjà mentionnée dans ces *Annales*. Rappelons seulement que, chaque année, des épizooties très meurtrières sévissent en de nombreux points de l'Empire Ottoman. Aujourd'hui, grâce à l'initiative prise par le Ministère de l'Agriculture, la lutte contre le typhus contagieux se poursuit systématiquement. On envoie successivement dans les différents vilayets des vétérinaires auxquels un stage à l'Institut Bactériologique a permis d'acquérir une instruction microbiologique générale et la pratique de la peste bovine. C'est à cette initiative que nous devons d'avoir été bien secondés dans nos missions, et nous en remercions sincèrement ici S. E. le Ministre de l'Agriculture et Eram Effendi, chef de la section technique de l'Agriculture. Tous les deux n'ont rien négligé pour rendre notre travail facile et fructueux.

Le typhus contagieux frappe toutes les races de bovidés ainsi que les buffles; il épargne les moutons, les chèvres, les porcs, etc... Lors des épidémies du vilayet d'Aïdin (1898) on a pu se convaincre que le chameau, lui aussi, était réfractaire à la maladie naturelle.

ÉPIDÉMIOLOGIE

Nous avons observé jusqu'ici trois grandes épidémies. L'une,


MER NOIRE
EPIDEMIES DE ROUMELIE
localités atteintes en 1888
localités atteintes en 1897, 98, 99
BOSPHORE
Constantinople
MER DE MARMARA
Kalfakeuy
Soubachi
Tchanakdjia
Eurdjinli
Izzeddin
Tchataldja
Tchakil
Deli Younus
Baklali
Yassi Varan
Dourseukeuy
Hadji machli
Imrahor
Philibos
Delikli kaya
Chamlar
Hadimkeuy
Eumerli
Tchorlou à 100 Kilm de Constantinople

qui apparut dans la région de Tchataldja (Roumélie) et s'étendit jusqu'aux abords de Constantinople (1897-98-99); l'autre, qui sévit dans le vilayet d'Aïdin (Anatolie) pendant l'année 1898; une dernière enfin qui fit de grands ravages dans la contrée de Yozgat (Anatolie) en 1898 et 1899. Voici, en quelques mots, l'histoire abrégée de ces épidémies.

1° *Épidémie de Roumélie.* — La région de Tchataldja (voir la carte ci-jointe) a été dévastée jadis à plusieurs reprises par des épizooties très meurtrières (1853-1863-1877). En 1888 l'affection a régné à Tchataldja, à Izzeddin, Bahchaich, Tchakil, Indjékeuy.

Jusqu'en 1897, la contrée est restée indemne, malgré la fréquence de la peste bovine dans la zone de Constantinople (et en particulier à Ismidt).

En novembre 1897, un paysan de Baba-Nakkache amène à Constantinople un chariot traîné par deux bœufs. Il attache ces bœufs dans une étable où se trouvaient des animaux malades (nous ignorons d'où provenaient ceux-ci). A son retour, un des bœufs meurt à Philibos, l'autre à Baba-Nakkache. Aussitôt le typhus contagieux éclate dans les deux villages. La maladie s'étend alors : d'une part à Doursounkeuy, Hadji-Machli, Imrahor, Haratchtji, Chamlar, Aya Yorgui, Délikli-Kaya, Eumerli, Hadimkeuy, Mouka — d'autre part à Soubachi, Kalfakeuy, Deli-Younous, Baklali — enfin jusqu'à Surgunkeuy et Epigados. L'épidémie *paraît* s'arrêter en février 1898. La manière dont la peste a été transportée de Baba-Nakkache à Soubachi mérite d'être mentionnée. Des paysans conduisaient un chargement de bois de Soubachi à Hadimkeuy : surpris par le froid, ils s'arrêtent pendant une nuit à Baba-Nakkache : les bœufs qui servaient à traîner les chariots s'infectent au contact d'animaux malades et, à leur retour, contaminent les troupeaux de Soubachi.

En juin 1898, le typhus apparaît à Eurdjunlu. Une enquête minutieuse démontre que l'affection n'a cessé de régner depuis février dans le village de Yassi-Viran où les pertes furent considérables. Les habitants avaient soigneusement caché les cas, par crainte des cordons et autres mesures sanitaires. La peste se transmit d'Eurdjunlu à Tchanakdja à la façon suivante. Un fermier, ayant conduit des bœufs de Tchanakdja à Eurdjunlu

apprit que la maladie régnait dans ce dernier village (elle avait été importée de Yassi-Viran). Il s'empressa de ramener les animaux à Tchanakdja, mais ceux-ci, déjà contaminés, infectèrent la localité. De là, le typhus s'étendit à Kestanélik et à Izzeddin. L'épidémie prit fin en juillet. Les pertes avaient été de 65 0/0 (race grise et buffles).

A ce moment, l'affection se montra à l'École d'agriculture de Halkali, ainsi que dans un village voisin (Kutchuk-Nakkache).

Cette dernière épizootie fut combattue avec succès par la sérothérapie. Les pertes, avant l'intervention, avaient été de 81,5 0/0 (races perfectionnées et race grise).

Tout paraissait terminé, lorsqu'en décembre 1898 une épidémie éclata à Tchorlou. La peste fut apportée par des animaux de Youvali, village dans lequel la maladie n'avait cessé depuis juin 1898. Elle occasionna 72,5 0/0 de mortalité et fut enrayée par le traitement sérothérapique. Depuis, aucun cas n'a été signalé en Roumélie.

2° *Épidémie du vilayet d'Aïdin.* — Cette épidémie, dont nous avons pu constater nous-mêmes les ravages à deux reprises, a été fort bien étudiée par le vétérinaire en chef, Hassan Effendi, auquel nous empruntons les quelques détails qui suivent.

Depuis 1894, la maladie règne dans la province. En 1894, elle a occasionné la perte de 50,000 animaux. En 1895, 5.000 bovidés ont péri. En 1896, la mortalité a été de 3,000 têtes ; en 1897, encore de 3,000. Enfin, en 1898, 500 animaux seulement ont péri ; il est vrai que peu de villages ont été atteints et que les mesures sanitaires ont été fort bien conduites.

La presque totalité des bovidés du vilayet d'Aïdin appartient aux races noires. La mortalité a été de 70 0/0 en 1898.

3° *Épidémie de Yozgat.* — (Vilayet d'Angora.) En novembre 1898, une commission, composée de Galib-bey (professeur aux Écoles vétérinaires militaire et civile) ; d'Abdullah bey (inspecteur vétérinaire au ministère de l'Agriculture) ; de Nicolaki Effendi (professeur à l'École vétérinaire civile) et de l'un de nous[1] fut envoyé à Yozgat pour établir d'une façon officielle et définitive l'utilité du traitement sérothérapique. Cette commission constata que la peste, qui régnait depuis six mois et avait occasionné des pertes considérables (plus de 30.000 animaux),

1. Le Dr Réfik-bey.

provenait de Zileh (vilayet de Trébizonde). A Zileh se tient chaque année une grande foire. En 1898, on amena à cette foire des animaux de la région de Baffra (alors fortement éprouvée, comme nous l'avons appris depuis); ces animaux en contaminèrent nombre d'autres qui apportèrent, à leur retour, l'affection dans la zone de Yozgat. Pareillement la foire annuelle de Yozgat fut l'origine de plusieurs épidémies qui s'étendirent jusqu'à Kir-Chehir (vilayet d'Angora). Les pertes, dans les villages visités par la commission, fut de 44,4 0/0 (races noires et buffles). Le traitement sérothérapique a fait disparaître rapidement la maladie.

Pendant ces dernières années, nous avons eu connaissance de nombreuses épizooties, qui sévirent dans diverses provinces de l'Empire (Moussoul, Diarbékir, Adana, Alep, Damas, Beyrouth, etc.). Nous avons pu étudier, en octobre 1898, à Constantinople même (Kutchuk-Tchiftlik), une petite épidémie dont l'origine est restée assez obscure et que les vaccinations ont fait cesser immédiatement.

L'observation attentive des épidémies précédentes nous a convaincus que la peste bovine se transmet surtout par le contact direct. C'est également l'opinion de nombreux auteurs (Koch, Nencki et ses élèves, etc.). Les animaux malades, les personnes qui les soignent, sont les agents habituels de la contamination. Les fourrages, les cornes, peaux, etc., peuvent également intervenir dans la transmission de la maladie. Par contre, le rôle du sol et des eaux nous paraît nul [1]. Les locaux infectés ne restent pas longtemps dangereux, si nous en croyons nos observations. Pour nous, le virus de la peste est essentiellement fragile et incapable de développement dans le milieu extérieur. Il suffirait donc, le plus souvent, des précautions les plus simples pour éviter l'infection. C'est ce que démontrent les faits suivants. Dans plusieurs villages, nous avons vu les habitants établir eux-mêmes des cordons et préserver ainsi leurs troupeaux. En 1898, dans le village de Mouha, le nommé Izzet-agha, dont l'étable n'était séparée d'une étable infectée que par une cloison de planches, réussit à protéger ses animaux en les tenant séquestrés pendant le temps que dura le typhus. Nous avons observé pareils faits dans les diverses épidémies. Enfin, à l'Institut Bactériologique,

1. Le rôle des insectes, admissible en théorie, ne nous a jamais paru évident jusqu'ici. Il y aurait lieu d'instituer des expériences précises à cet égard.

nous n'avons jamais constaté de contamination d'une case à l'autre, circonstance qui tient à ce que les animaux infectés sont soignés exclusivement par un personnel spécial. Nous ajouterons, en passant, que jamais non plus nous n'avons pu contaminer les animaux en les plaçant dans une case préalablement infectée, puis désinfectée avec soin (lavages au crésyl) : le virus paraît donc facile à détruire.

Mais, quelque élémentaires en apparence que soient les précautions indiquées, l'infection se produit avec une extrême facilité si on les néglige. L'histoire des épidémies le prouve surabondamment : rien n'est plus simple aussi que de contaminer les bovidés par cohabitation.

D'un village (ou d'un pays) à un autre la peste se transmet donc, dans la majorité des cas, par l'intermédiaire des animaux malades. La diffusion est en raison directe de la facilité des communications. La rareté des routes, la nature accidentée du sol, l'hiver rigoureux, sont les causes qui circonscrivent d'ordinaire le typhus.

FORMES CLINIQUES. — MALADIES ASSOCIÉES

Dans le plus grand nombre des cas, la peste bovine naturelle ne diffère pas de la maladie inoculée, telle qu'elle a été déjà décrite dans ces *Annales*. Mais à côté de cette affection type, cyclique, on observe parfois d'autres formes qu'il convient de mentionner ici.

Forme type. — Nous la résumerons brièvement, en insistant seulement sur la marche de la guérison. Au point de vue de l'application du sérum, nous la divisons en trois phases.

1. *Phase fébrile*. — Elle s'annonce (après une incubation de 3 à 5 jours) par une élévation thermique supérieure à 40° (et le plus souvent à 40°,5), et se traduit par la fièvre et l'inappétence : pas d'autres signes. La durée est de 2 à 3 jours.

2. *Phase des lésions externes*. — Exprimée par la conjonctivite, le coryza et la stomatite. La fièvre se maintient sans rémissions notables et l'état général s'aggrave (tristesse, abattement, anorexie complète). La durée est de 2 à 3 jours.

3. *Phase des lésions gastro-intestinales*. — Elle débute par la diarrhée (alimentaire, puis séreuse et souvent sanguinolente), à laquelle vient se joindre rapidement l'hypothermie dans les cas

mortels. Lorsque la terminaison fatale doit se produire (après 1 à 2 jours, rarement plus) les phénomènes généraux s'aggravent à vue d'œil. Si, au contraire, l'animal doit guérir, tout se borne à une augmentation de la faiblesse, et à une émaciation de plus en plus marquée.

Guérison. — Elle s'annonce, assez brusquement, par le retour de l'appétit ; l'animal accepte les boissons et prend même quelques aliments solides ; la station debout est plus fréquente qu'auparavant. Puis le jetage et le larmoiement diminuent et cessent en un à deux jours ; les érosions buccales se détergent et se cicatrisent en trois ou quatre jours ; la diarrhée persiste plus longtemps. Il n'est pas rare, en effet, de voir des animaux qui ont déjà repris leur vivacité habituelle et dont l'appétit est redevenu satisfaisant, présenter encore une diarrhée abondante (et même sanguinolente) durant plus d'une semaine. A peine la guérison s'annonce-t-elle que la fièvre tombe, d'habitude progressivement (chute en escalier). Il est à noter que les sujets qui ont subi une atteinte tant soit peu forte maigrissent beaucoup au début de la convalescence et ne reprennent que lentement leur poids primitif.

Parfois, surtout lorsqu'il s'agit d'animaux jeunes, la guérison n'est qu'apparente et la mort survient en deux à trois semaines par épuisement, avec une diarrhée persistante.

Lésions. — Elles ne diffèrent pas de celles qui ont été mentionnées dans un travail précédent. Nous noterons seulement que la tuméfaction et l'ulcération des plaques de Payer et des follicules clos de l'intestin sont certainement plus fréquentes dans l'affection naturelle que dans la maladie expérimentale.

Forme intestinale. — Parfois, un ou deux jours après le début de la fièvre, la diarrhée se manifeste comme première localisation ; elle reste le symptôme principal, mais n'apporte pas par elle-même un élément spécial de gravité. Les autres lésions sont d'ordinaire peu accentuées et peuvent manquer partiellement.

Formes incomplètes. — Elles échappent à toute description, car on peut observer diverses combinaisons symptomatiques. Disons seulement que la conjonctivite manque dans un certain nombre de cas, le coryza également ; la diarrhée moins souvent, la stomatite plus rarement encore, la fièvre *jamais*. Les formes

incomplètes, fréquemment curables, se voient principalement chez la race grise.

Forme des jeunes animaux. — Les sujets âgés de moins de 6 à 8 mois peuvent succomber sans avoir présenté d'autres signes que la fièvre et l'abattement. Le fait n'est pas rare. La faiblesse peut être assez accentuée pour simuler une véritable paralysie des membres. Cette forme curieuse a été observée également dans les expériences faites à l'Institut Bactériologique. A l'autopsie, on ne rencontre comme lésions caractéristiques que l'aspect spécial du foie (foie « en cire »).

Mortalité. — Les races perfectionnées paient toujours un lourd tribut au typhus. Pour elles on peut évaluer la mortalité à plus de 80 0/0 (souvent même à plus à 95 0/0). Les autres races, ainsi que les buffles, se montrent plus ou moins sensibles selon les épidémies, et selon les localités atteintes pendant une même épidémie.

Le tableau suivant démontre pleinement ce dernier point.

Région de Yozgat. Mortalité des bovidés (races noires), dans huit villages atteints en même temps.

Salir	30 3 °/o
Kemalli	32 5 °/o
Erbek	36 5 °/o
Peyk	37 9 °/o
Akdja-Dam	39 °/o
Dédé-Fakili	42 6 °/o
Dayli	43 3 °/o
Akdja-Kichla	67 8 °/o

Il faut donc tenir compte, pour expliquer le chiffre de la mortalité, non seulement de la race, mais encore des circonstances épidémiques, c'est-à-dire du degré d'activité du virus à un moment et à un endroit donnés.

La mortalité des races noires dans les villages visités par la Commission ministérielle (Yozgat) a été de 44, 4 0/0 en moyenne. La mortalité pour les mêmes races dans le vilayet d'Aïdin a dépassé 70 0/0 (moyenne de l'année 1898) ; et près d'Aïdin, dans le village d'Eski-Tchiftlik, nous avons vu périr plus de 95 0/0 des animaux.

Il faudrait tenir compte également de l'immunité conférée par les atteintes antérieures. Toutefois, ce dernier facteur n'a joué aucun rôle dans les localités où nous nous sommes rendus.

A moins de rassembler des chiffres considérables, on risquerait donc d'aboutir à des conclusions inexactes si l'on voulait

juger de la sensibilité absolue des diverses races par l'étude des épidémies. Or, cette sensibilité doit servir de base à la sérothérapie. Aussi importe-t-il de la déterminer par l'expérimentation directe. Voici, à cet égard, ce qui a été observé à l'Institut Bactériologique par M. le Dr Nicolle et Adil bey.

1. Les races perfectionnées et les races noires succombent *toujours* à l'infection expérimentale. La race grise peut résister ou contracter une maladie curable ; elle est donc bien moins sensible que les autres.

2. La quantité de sérum nécessaire pour préserver (et surtout pour guérir) les animaux des races perfectionnées est *toujours* supérieure à celle que nécessitent les races noires.

Aussi divisons-nous pratiquement les bovidés en trois groupes: races moyennement sensibles (race grise); races sensibles (races noires); et races très sensibles (races perfectionnées) : Alep, Crimée, Egypte, Odessa). Les buffles tiennent le milieu entre les races noires et la race grise. Comme nous n'avons pas fait d'expériences sur eux, nous les assimilons, d'après l'observation clinique et provisoirement, aux races noires, au point de vue sérothérapique.

PESTE BOVINE ET MALADIES ASSOCIÉES

Malaria des bovidés. — Cette affection a déjà été décrite ici, soit comme maladie naturelle (animaux importés) soit comme maladie expérimentale associée à la peste bovine (animaux indigènes). Nous dirons un mot des rapports de la malaria avec le typhus chez les animaux indigènes et lors des épizooties.

La fréquence des hématozoaires chez les bovidés atteints de peste est des plus variables. Voici quelques chiffres :

Epidémies de Roumélie. — Le sang de tous les animaux examinés à Soubachi et à Doursounkeuy contenait le pirosoma. Sur 36 bovidés suivis quotidiennement à Tchanakdja et Eurdjunli, 15 ont présenté des hématozoaires. Lors de l'épidémie de Halkali le parasite existait dans la moitié des cas.

Epidémies du vilayet d'Aïdin. — A Eski-Tchiftlik 17 animaux ont été examinés (une seule fois), 16 ont montré le pirosoma. A Sidi Keuy et à Soma (près de Smyrne) les trois cinquièmes des bovidés contenaient l'agent malarique dans le sang.

D'ordinaire le parasite reste latent; rien n'indique sa pré-

sence et il paraît sans influence sur la marche de la peste. Quelquefois il se traduit par une fluidité spéciale du sang, qui noircit rapidement après la mort : plus rarement par les signes classiques de la fièvre du Texas. Inutile de rappeler ce qui a été déjà dit dans ces *Annales*. Lorsque l'hématozoaire demeure latent, il semble n'entraver en rien l'action du sérum antipestique ; au contraire, lorsqu'il se manifeste par les symptômes malariques, il semble empêcher le plus souvent toute thérapeutique.

Fièvre aphteuse. — Il est aisé de distinguer cette affection du typhus contagieux. Mais il faut savoir qu'elle peut coexister avec lui. Nous en avons vu plusieurs exemples. La fièvre aphteuse se reconnaît aux lésions caractéristiques de la langue, de la lèvre supérieure, de l'espace interdigité, etc. Elle n'a pas paru aggraver sensiblement la peste bovine, mais nos observations sont insuffisantes pour trancher cette question de pronostic.

SÉROTHÉRAPIE

Les premières expériences de sérothérapie ont été entreprises au laboratoire et répétées pendant un certain temps à titre de démonstration. La première application en grand n'a pu avoir lieu qu'au moment de l'épidémie de Halkali. Comme les résultats ont été excellents, le Ministère de l'Agriculture a décidé d'intervenir immédiatement lors des épizooties de Yozgat et de Tchorlou. En même temps l'Institut Bactériologique était chargé de préparer une plus grande quantité de sérum. Le sérum employé par nous était toujours actif à la dose préventive minima de 25 c. c. (titrage par le procédé Kolle et Turner). Toutes les fois qu'il a été possible, on a mélangé le sérum fourni par les divers animaux hyperimmunisés. Le titre de ce mélange est descendu progressivement de 25 à 5 c. c. (chiffre actuel, communiqué par M. le Dr Nicolle et Adil bey). Les doses injectées ont été souvent inférieures (trop inférieures même) à celles qu'indique l'*instruction ci-jointe*. C'était une conséquence forcée des premiers essais en grand, sur des races variées et dans des épidémies de gravité différente.

INSTRUCTION POUR L'APPLICATION DU SÉRUM ANTIPESTIQUE [1]

Prendre la température de tous les animaux de l'endroit contaminé. Ceux qui présentent une élévation thermique égale ou supérieure à 40° seront

1. Nous proposons d'appeler ainsi ce sérum (par abréviation) afin de le distinguer du sérum antipesteux d'Yersin.

considérés comme *malades*, qu'ils aient ou non les signes classiques de l'affection. Ceux qui n'ont pas de fièvre seront considérés comme *suspects*. D'où deux modes d'intervention : préventive (traitement des suspects) et curative (traitement des malades).

Traitement préventif. — Parmi les suspects, il peut y avoir des sujets sains et des sujets en voie d'incubation : rien ne permet de les distinguer dès l'abord. Deux méthodes peuvent être appliquées aux suspects, quelle que soit leur race.

1° *Méthode générale*[1]. — Injecter 25 c. c. de sérum. Prendre la température le troisième et le cinquième jour (c'est-à-dire après deux fois et après quatre fois 24 heures). Si l'animal reste apyrétique, la vaccination est terminée. S'il montre, lors d'une des prises des températures, une élévation égale ou supérieure à 40°, on injectera une seconde dose de 25 c. c. Dans ce dernier cas, il est évident que l'animal était déjà en incubation au moment de la première intervention. (L'incubation de la peste bovine est, en moyenne, de 4 fois 24 heures.)

2° *Méthode d'exception.* — Si l'on se trouve dans l'impossibilité de suivre les animaux, on injectera 50 c. c. de sérum en une fois et la vaccination sera terminée. Ce procédé simple et rapide a l'inconvénient de dépenser trop de sérum[2].

Traitement curatif. — La peste bovine confirmée offre pratiquement trois phases : période fébrile (fièvre et anorexie) ; période des lésions externes (conjonctivite, coryza, stomatite); période des lésions gastro-intestinales (diarrhée, puis algidité).

On emploiera des doses de sérum variables selon l'âge de la maladie et la race des animaux.

1re *période.* — Injecter une fois pour toutes :

Aux races moyennement sensibles (race grise de Roumélie).	100 c.m.c.
Aux races sensibles (races noires d'Anatolie)...............	150 c.m.c.
Aux races très sensibles (races de Crimée, Odessa, Alep, Égypte)..	200 c.m.c.

Les buffles sont assimilables, comme sensibilité, aux animaux de race noire.

2e et 3e *Périodes.* — Injecter une fois pour toutes :

Aux races moyennement sensibles........................	200 c.m.c.
Aux races sensibles..	250 c.m.c.
Aux races très sensibles..................................	300 c.m.c.

1. Cette injection du sérum en deux fois a été employée déjà par MM. Danys et Bordet dans un procédé différent (sérum et virus).

2. Il est évident que l'immunité conférée par le sérum serait encore plus durable si l'on injectait des doses supérieures à celles que nous indiquons ici. La quantité de sérum dont nous disposons ne nous permet pas de dépasser un maximum de 50 c. c. Du reste notre sérum possède actuellement une grande activité.

L'intervention à la troisième période est contre-indiquée en présence d'une diarrhée profuse, d'un état général trop grave et, naturellement, d'un début d'hypothermie (température égale ou inférieure à 40°). D'ailleurs, pour l'opportunité de cette intervention, le vétérinaire se basera sur la marche de l'affection, la sensibilité des races, la gravité de l'épidémie régnante et la quantité de sérum dont il dispose.

Remarques. — Dans les cas graves, l'injection intra-veineuse est supérieure à l'injection sous-cutanée.

Les sujets soumis au traitement devront être protégés contre le froid et régulièrement alimentés (thé de foin, barbottages de farine, et même lait, s'il s'agit d'animaux de prix) : au besoin on introduira directement les boissons dans le pharynx. Ces soins constituent un complément important de la sérothérapie. Le traitement échouera le plus souvent chez les animaux déjà tuberculeux ou chez ceux qui sont atteints à la fois de peste bovine et de malaria des bovidés.

Les doses prescrites pour le traitement curatif ont été *intentionnellement exagérées*. Lorsque le personnel vétérinaire sera complètement familiarisé avec la sérothérapie antipestique, nous indiquerons dans quelle mesure on peut les réduire...

Suit la technique de l'injection du sérum, qui n'offre pas d'intérêt spécial. Chaque vétérinaire est muni d'un nécessaire contenant tous les instruments indispensables.

Après entente avec le Ministère de l'Agriculture il a été décidé de se borner provisoirement à la sérothérapie comme unique moyen préventif. Plus tard, on pourra entreprendre des vaccinations avec le sérum et le virus. Nous avons plusieurs fois fait usage, à titre de démonstration, du procédé de MM. Kolle et Turner. Il nous a donné de bons résultats.

Voici maintenant nos statistiques concernant l'emploi du sérum :

ÉCOLE D'AGRICULTURE DE HALKALI

Mortalité avant l'intervention (races perfectionnées et race grise).. 81,5 %

Animaux traités préventivement.	sains : 29 (21 gris, 8 perfectionnés); en incubation : 12 (1 gris, 11 perfectionnés);	Pas de mortalité.
Animaux traités curativement (tous de races perfectionnées).	1re période 8; mortalité ..	12,5 %
	2e et 3e périodes 9; mortalité................	22,2 %

(Nous n'avons pas fait figurer dans ce tableau : 2 animaux inoculés au stade hypothermique; 1 animal mort de charbon pendant son rétablissement; et 1 mort d'hémoglobinurie associée.)

RÉGION DE YOZGAT

1° *Villages où s'est rendu la Commission désignée par le ministère de l'Agriculture.*

Mortalité avant l'intervention (races noires et quelques buffles). 44,4 %

Animaux traités préventivement (tous ces animaux ont été ensuite exposés à la contamination).	sains : 862 ; mortalité.........	0,1 %
	en incubation : 60 ; mortalité..	1,7 %
Animaux traités curativement.	1re période : 79 ; mortalité.....	6,3 %
	2e et 3e période : 12 ; mortalité.	25 %

Les animaux traités (préventivement et curativement) appartenaient aux races noires ; parmi eux se trouvaient 40 buffles.

(On n'a pas fait figurer dans la statistique 8 animaux morts d'hémoglobinurie associée.)

2° *Village de Sousiz keuy. Statistique du vétérinaire du vilayet d'Angora, Wasfi Effendi.*

Mortalité avant l'intervention (races noires).................. 57,1 %

Animaux traités préventivement.	Sains : 87.	Pas de mortalité.
	En incubation : 6.	
Animaux traités curativement.	1re période : 3 ; pas de mortalité.	
	2e et 3e périodes : 3 ; 2 morts.	

TCHORLOU

Mortalité avant l'intervention (race grise et 1/3 de buffles)..... 72,5 %

Animaux traités préventivement.	Sains et en incubation : 2,088 ; mortalité....................	0,14 %
Animaux traités curativement.	1re période : 35 ; mortalité...	14 %
	2e et 3e périodes : 38 ; mortalité.	26 %

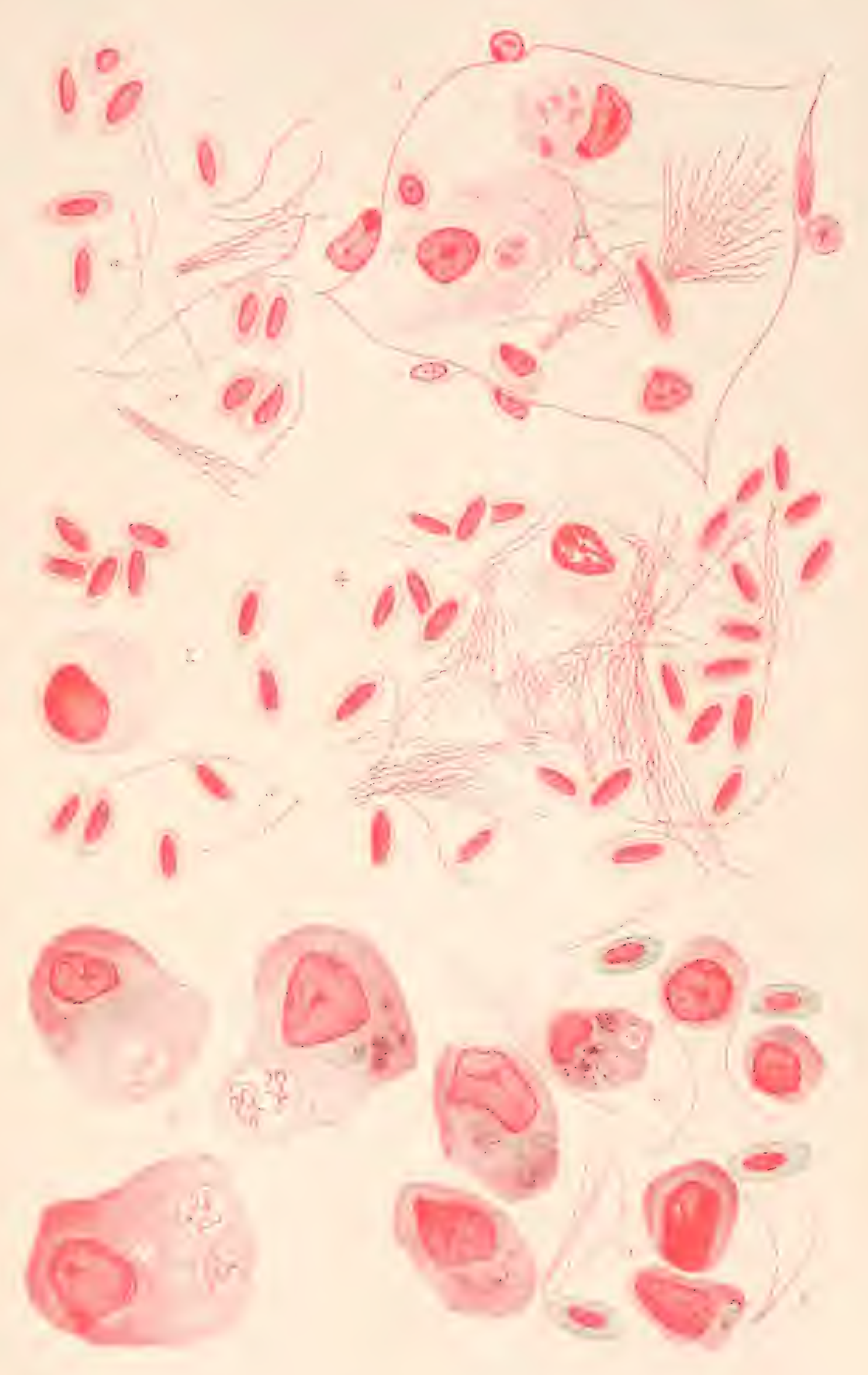
Les tableaux précédents montrent une fois de plus que le sérum constitue un excellent moyen préventif et curatif. Si les chiffres ne sont pas aussi parfaits que ceux obtenus dans les expériences de laboratoire, cela tient à ce que, d'abord, nous n'avons pas toujours injecté des quantités de sérum suffisantes ; ensuite (et surtout) nous avons dû, à plusieurs reprises, et vu l'urgence, faire usage de sérums de force variable.

Ces conditions défavorables étaient d'ailleurs prévues d'avance et n'ont pas empêché le Ministère de l'Agriculture de considérer les résultats comme des plus satisfaisants.

Le Gérant : G. MASSON.

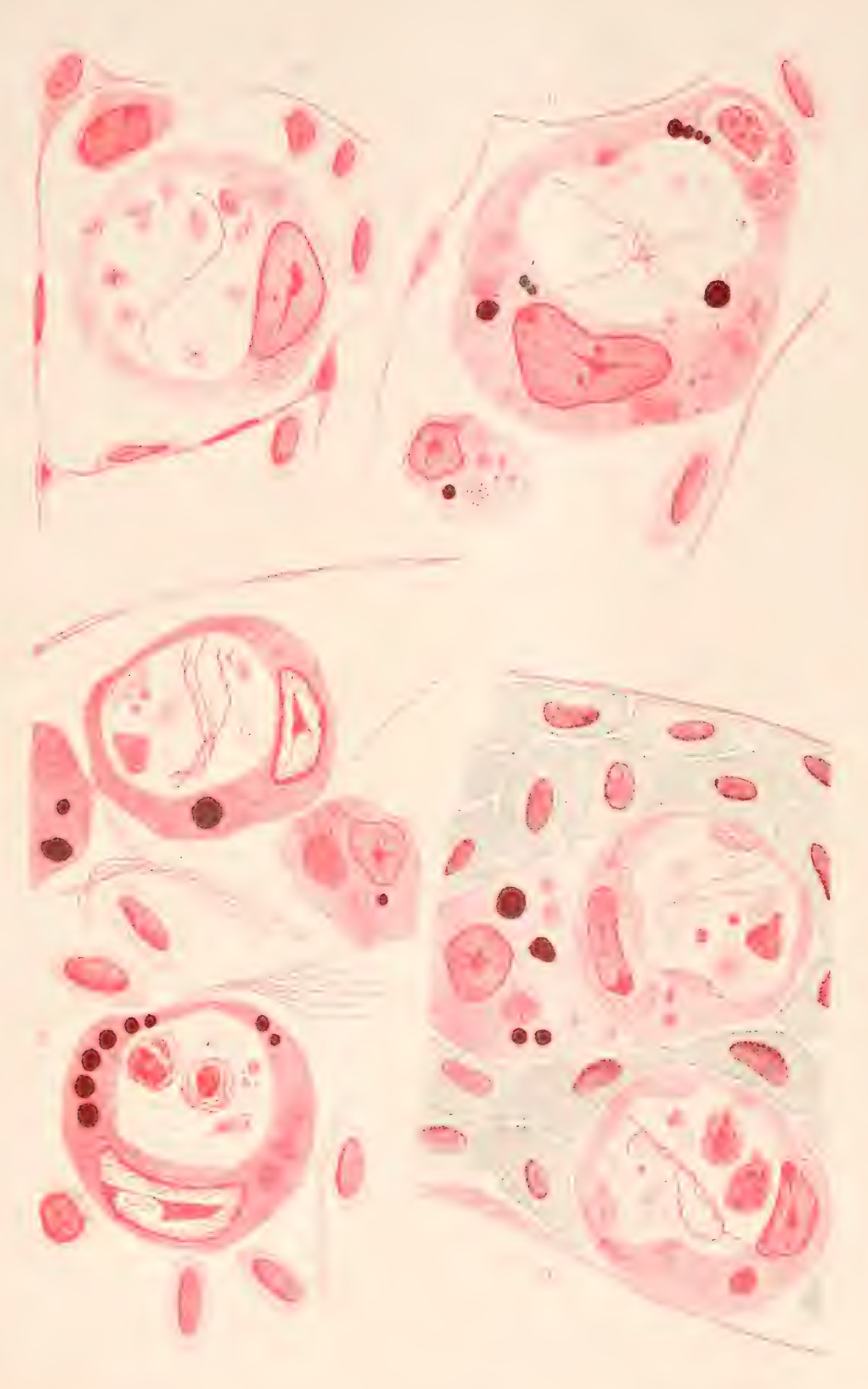
Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.


1
2
3
4
5
6
7
8



J. Cantacuzène, del. V. Roussel, lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris.



J. Cantacuzène, del. V. Roussel, lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris

13me ANNÉE AOUT 1899 N° 8

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES SUR L'ANGINE A BACILLES FUSIFORMES

PAR M. H. VINCENT

Médecin-major de 2e classe, Professeur agrégé au Val-de-Grâce.

(Travail du Laboratoire de Bactériologie du Val-de-Grâce)

I

Le bacille de Löffler n'est pas le seul microbe capable de provoquer des exsudats pseudo-membraneux à la surface des muqueuses et de la peau. On sait qu'un assez grand nombre de bactéries, qui habitent normalement la cavité buccale peuvent également déterminer, sur la muqueuse du pharynx, des lésions plus ou moins analogues à celles de la diphtérie. Enfin on a constaté chez les animaux des affections pseudo-membraneuses qui relèvent de microbes n'ayant aucun rapport avec le bacille de Löffler.

L'affection dont je vais parler, et que j'ai eu l'occasion d'observer dès l'année 1893, mérite d'être rapprochée des angines pseudo-membraneuses pouvant simuler la diphtérie. Elle est caractérisée, en effet, surtout à son début, par un exsudat couenneux blanchâtre ou grisâtre, développé à la surface d'une amygdale. Elle s'accompagne d'adénite, parfois assez prononcée, de dysphagie, de fièvre, et réalise ainsi les principaux symptômes de l'angine diphtérique. Aussi est-il permis de penser qu'elle est, d'habitude, confondue avec cette dernière affection. Elle s'en

sépare, cependant, par certaines particularités cliniques spéciales, et, de plus, elle paraît être sous la dépendance d'un bacille caractéristique, facile à distinguer du bacille de Löffler.

La première mention de cette nouvelle forme d'angine et de son agent pathogène a paru, dans ces *Annales*[1], à propos d'un travail sur la Pourriture d'Hôpital : il existe, en effet, une grande analogie entre le bacille de cette dernière affection et celui de l'angine diphtéroïde. J'ai fourni la description clinique de cette angine dans deux communications à la *Société Médicale des Hôpitaux*[2]. Depuis lors, un certain nombre d'auteurs ont publié, sur le même sujet, des travaux confirmatifs ; on en trouvera la mention dans l'index bibliographique placé à la fin de ce mémoire.

Avant d'aborder l'étude bactériologique de cette affection, il y a lieu de signaler brièvement les caractères cliniques qu'elle présente.

Au début de la maladie, l'amygdale est recouverte d'un placard pseudo-membraneux blanchâtre ou grisâtre peu épais, pouvant être détaché par le raclage. Enlevée, la fausse membrane s'est reproduite le lendemain ; elle repose très souvent, dès ce moment, sur une surface légèrement érodée. Vers le troisième ou le quatrième jour, la pseudo-membrane est plus épaisse, mais plus molle, bien qu'elle ne se laisse pas dissocier aisément dans l'eau.

A ce moment, l'affection peut suivre deux marches différentes. Dans sa forme la moins fréquente, la fausse membrane est cohérente. Elle repose sur une exulcération très superficielle de la muqueuse et ne tarde pas à se détacher par l'un de ses bords, et à disparaître, déglutie ou rejetée par l'expuition. Le lendemain, on trouve, à la même place, une nouvelle fausse membrane plus mince, qui disparaît, à son tour, au bout de quelques jours. La fièvre dure deux ou trois jours et n'est jamais très élevée. Les ganglions sous-maxillaires sont tuméfiés.

Dans la deuxième forme de l'affection, il se développe d'une manière précoce, sous la fausse membrane, une sorte d'ulcère

1. H. Vincent. Sur l'étiol. et sur les lésions anatomo-pathol. de la Pourriture d'Hôpital. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, p. 492, 1896.

2. H. Vincent. Sur une forme particulière d'angine diphtéroïde (angine à bacilles fusiformes). *Soc. Médic. des Hôp.* 17 mars 1898.

Id. Nouvelles recherches sur l'angine à bac. fusiformes. *Ibid.* 12 janvier 1899.

plus ou moins profond. L'exsudat est mou, grisâtre ou gris-jaunâtre, d'apparence crayeuse et d'odeur fétide. Sous cet exsudat, la surface de l'ulcération est tomenteuse et saigne facilement. La muqueuse pharyngée avoisinante est rouge et œdématiée. La dysphagie est, parfois, très vive ; plus tard elle devient presque nulle. La fausse membrane peut envahir l'amygdale opposée et la luette. Cette variété s'accompagne d'adénite sous-maxillaire parfois prononcée. La fièvre ne dépasse guère 38°-39°, et dure quelques jours, pendant lesquels le malade accuse de la courbature, de l'inappétence et un état saburral des premières voies. L'amygdale se nettoie vers le huitième ou le dixième jour, en moyenne, et l'ulcération ne tarde pas à se cicatriser sous l'influence d'un traitement antiseptique local. Dans certains cas, l'affection est plus tenace ; elle peut durer plusieurs semaines sans fièvre et sans autre trouble fonctionnel qu'une dysphagie plus ou moins marquée. Nicolle a observé un cas dans lequel la durée a été de deux mois.

Il existe donc, au point de vue clinique, deux formes principales de la maladie, l'une, *diphtéroïde*, dans laquelle la fausse membrane recouvre une exulcération insignifiante ou légère : cette variété est la moins commune et simule entièrement la diphtérie. La seconde forme est primitivement diphtéroïde et secondairement *ulcéro-membraneuse*. Ces deux variétés cliniques de l'angine correspondent, ainsi qu'on va l'établir, à un processus bactériologique un peu différent : le bacille pathogène est pur dans le premier cas, tandis que, dans le second, il est associé à une autre bactérie.

Je n'ai, personnellement, observé cette affection que chez l'adulte. Toutefois, elle est assez fréquente chez les jeunes enfants et peut présenter chez eux une marche très grave[1], alors que son pronostic est, au contraire, bénin chez l'adulte.

Le diagnostic de cette angine se fait surtout par l'examen microscopique.

II

Examen bactériologique de l'exsudat. — Si l'on prélève un peu de l'exsudat développé à la surface du pharynx, et qu'on l'exa-

1. M. le Dr Richardière m'a dit en avoir observé des cas assez nombreux chez les enfants isolés dans le pavillon des suspects du service de la diphtérie, à l'hôpital Saint-Antoine.

mine au microscope après coloration par la thionine ou par le liquide de Ziehl dilué, on constate la présence, en quantité parfois colossale, d'un *bacille* d'aspect très particulier. Ses dimensions sont assez variables, les plus courts sont de 6 à 8 μ; la longueur habituelle est de 10 à 12 μ. Ce bacille est donc plus volumineux que le bacille de Löffler. Il est, parfois, très long et peut même devenir filamenteux. Il reste, néanmoins, facilement reconnaissable grâce à sa forme : sa portion moyenne est, en effet, légèrement renflée, tandis que ses deux extrémités sont nettement amincies et effilées. De plus, ce bacille est tantôt rectiligne, tantôt infléchi en virgule, principalement dans ses formes jeunes et courtes. Ces bacilles sont généralement isolés; on en trouve cependant quelques-uns disposés bout à bout. Ils n'affectent jamais les groupements caractéristiques du bacille de la diphtérie.

On les trouve en quantité extrêmement abondante, surtout au début de l'angine; ils sont tantôt dispersés en semis uniforme, dans le champ de la préparation, tantôt assemblés, en nombre véritablement extraordinaire, sous forme d'amas irréguliers, parfois de faisceaux composés d'éléments divergents, presque radiés.

Ce bacille présente assez souvent des *formes d'involution* : on constate, dans sa continuité, des vacuoles incolores, à peu près arrondies, mais inégales entre elles, au nombre de une à trois, quatre ou davantage selon la longueur du microbe. Lorsque cette portion claire est unique et qu'elle existe au milieu du bacille, celui-ci ressemble à une navette. Ces espaces clairs sont apparents dans les préparations traitées par un colorant peu énergique. La coloration par le liquide de Ziehl non dilué est trop intense et dissimule ces vacuoles. Celles-ci ne correspondent pas à des spores. En effet, elles sont de volume inégal et ne se teintent pas par les procédés qui colorent les spores. On rencontre surtout ces bacilles vacuolaires dans les cas déjà soumis à un traitement antiseptique. Il existe, du reste, d'autres formes d'involution dans lesquelles le bacille affecte des formes géantes, est granuleux et se colore mal. Certains bacilles ont des contours irréguliers; leur protoplasme est échancré. Parfois, le centre du bacille est considérablement renflé, incolore, et les contours de ce renflement ampullaire sont simplement marqués par un fin linéament.

L'aspect ordinaire du bacille est cependant celui qui a été signalé en premier lieu : extrémités amincies et portion centrale renflée en fuseau. En raison de cet aspect, on peut donc l'appeler *bacille fusiforme* (*fig.* 1).

Le bacille se colore bien par les couleurs d'aniline. Le colorant de choix est la thionine phéniquée, ou bien le liquide de Ziehl dilué au quart. La liqueur iodo-iodurée ne produit pas, sur

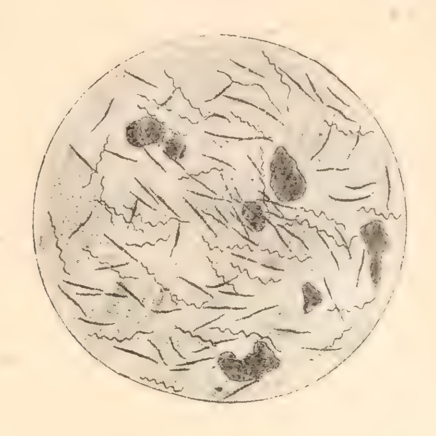


Fig. 1. — Frottis de fausse membrane. Bacilles fusiformes avec association spirillaire.

ce bacille, de réaction bleue ni brun-acajou ; par contre le chloroiodure de zinc donne au corps bacillaire une teinte brunâtre (Sabrazès).

Indépendamment de l'aspect tout particulier et des dimensions du bacille fusiforme, il est un caractère qui permettra de le différencier d'autres bacilles qu'on peut être exposé à rencontrer dans les préparations, notamment du bacille de Löffler : le bacille fusiforme ne se laisse pas colorer par la méthode de Gram ou de Weigert. La double coloration par le procédé de Gram et par la fuchsine rendra donc des services dans les cas qui pourraient paraître douteux.

Il importe de faire remarquer que les bacilles fusiformes présentent leur maximum d'abondance dans les premiers jours de la maladie. Un peu plus tard, surtout dans la forme ulcéreuse de l'angine, les innombrables bactéries qui pullulent dans

la bouche envahissent à leur tour la fausse membrane et se mélangent au bacille, alors qu'au début celui-ci se montre à peu près seul. Quelle que soit, du reste, la période, ancienne ou récente, de l'affection, c'est seulement à la surface que se multiplient les microbes étrangers. Le bacille est abondant et pur dans la partie profonde de la fausse membrane.

Lorsqu'on examine au microscope, et à l'état frais, un peu de la fausse membrane dissociée dans une goutte d'eau, on constate que le bacille fusiforme est immobile ou paraît animé de mouvements douteux.

Les essais de culture de ce bacille soit à l'air, soit dans le vide, ont, jusqu'ici, toujours échoué. Des parcelles de fausse membrane, ensemencées avec soin sur le sérum animal ou le sérum humain, ou bien à la surface de la gélose glycérinée, dans le lait, le liquide d'ascite, la gélatine additionnée d'urine alcalinisée, etc., n'ont donné lieu à aucun développement de ce microorganisme. Les cultures ont fourni, en nombre parfois insignifiant, quelques colonies soit du staphylocoque, soit du streptocoque, soit du *B. Coli*, ce dernier dans un cas sur quinze. Raoult et Thiry ont isolé, de la même manière, quelques colonies du *B. Coli* ou du pneumocoque. C. Nicolle a eu de très rares colonies de cocci. Les cultures ne m'ont jamais donné le bacille de Loffler ou le b. pseudo-diphtérique. La présence de quelques colonies étrangères dans les milieux ensemencés (qui est régulièrement constatée aussi dans les cultures de membranes diphtériques) ne saurait surprendre. Elle s'explique par la constance habituelle de ces microorganismes, et même du pneumocoque (Griffon et Besançon) dans la cavité buccale. L'examen direct des coupes de la fausse membrane dans l'angine à bacilles fusiformes montre, du reste, que les microbes adventices y sont très rares.

Il y a lieu, cependant, de faire une exception pour la forme *ulcéro-membraneuse* de l'angine. L'examen bactériologique montre, en effet, que dans cette variété, qui est la plus fréquente, le bacille est associé à un spirille que l'on peut trouver en proportion parfois très abondante (*fig.* 1). Alors que la forme pure de l'angine est caractérisée par une production diphtéroïde à la surface de l'amygdale, sans perte de substance du tissu sous-jacent, dans la forme associée la lésion s'étend, au contraire,

en profondeur, et amène la nécrose avec ulcération de la surface de l'amygdale. Cette ulcération apparaît dès le 3e ou le 4e jour, parfois dès le second. Sur 18 cas d'angine à bacilles fusiformes que j'ai observés, j'ai constaté 3 cas de forme pure, *diphtéroïde*, et 15 cas avec association spirillaire (forme primitivement diphtéroïde et ultérieurement *ulcéro-membraneuse*).

Étant donnée l'abondance du spirille dans certains cas, il est vraisemblable que sa symbiose avec le bac. fusiforme favorise la végétation de ce dernier à la surface du pharynx. Il y a donc lieu de dire quelques mots de ce spirille.

Celui-ci est fort ténu. Il se colore moins bien que le bacille fusiforme. Il ne prend pas le Gram. Le nombre des spirilles est variable. Tantôt on les trouve en quantité considérable ; tantôt, au contraire, ils sont rares. Dans la profondeur de la fausse membrane, ils sont beaucoup moins nombreux qu'à sa surface : c'est un fait également constaté par Nicolle.

A l'état frais, tantôt on les trouve immobiles ou peu mobiles (Raoult et Thiry), tantôt, au contraire, ils sont doués de mouvements rapides ; Nicolle a constaté que « leur corps flexible, élastique, se tend et se détend comme un ressort à boudin » et il en fait de véritables spirochætes.

Je n'ai pas réussi à cultiver ces microbes. Ils paraissent, du reste, très analogues aux spirilles qui existent normalement dans la salive et le tartre dentaire, et qui ne sont pas cultivables.

Il était intéressant de rechercher si, de même que le spirille ou spirochæte qui lui est si souvent associé, le bacille fusiforme se rencontre également dans la bouche des sujets sains. A cet effet, j'ai examiné l'enduit lingual, le tartre dentaire et l'enduit pharyngé de 18 sujets exempts de toute angine. Dans 14 cas, j'ai pu constater, par l'examen microscopique, quelques bacilles facilement reconnaissables à leur portion centrale renflée, à leurs extrémités amincies, à leur forme parfois infléchie et à leur non coloration par la méthode de Gram.

Ce bacille, qui paraît donc être un hôte très fréquent de la cavité buccale, peut du reste encore se retrouver, quoique en proportion toujours très faible, dans les diverses espèces d'angines à fausses membranes. En explorant, en effet, avec soin les préparations faites avec les frottis d'angine diphtérique, il est bien rare qu'on ne trouve pas çà et là, dans le champ de la

préparation, au milieu des bacilles de la diphtérie, quelques exemplaires du bacille fusiforme. J'ai fait la même constatation dans l'angine à streptocoques et dans un cas d'angine colibacillaire. J'ai pu constater également quelques bacilles fusiformes au milieu d'innombrables microcoques développés à la surface d'exulcérations résultant d'une angine herpétique. Il est aisé de comprendre qu'à la faveur des lésions — quelle qu'en soit la nature — de la muqueuse pharyngée, la bacille fusiforme végète, au même titre que les autres bactéries, saprophytes ou pathogènes, qui existent dans la bouche. Certains faits me porteraient à penser que ce microbe peut pulluler abondamment à la surface des ulcérations syphilitiques de la bouche et du pharynx. Freyche a observé un cas de ce genre [1].

Il est probable que le même bacille peut intervenir dans certaines suppurations voisines de la cavité buccale. Lichtwitz et Sabrazès ont constaté que, dans un cas d'angine à bacilles fusiformes, ce bacille était en très grande abondance dans le pus concret et fétide d'un empyème du sinus maxillaire. De même, dans un abcès péri-laryngien, il était associé au streptocoque et au pneumocoque.

Le bacille fusiforme est-il pathogène pour les animaux? Malgré des essais nombreux, je n'ai pu réussir à déterminer des lésions bien notables en inoculant l'exsudat diphtéroïde sur la conjonctive ou à la surface de la muqueuse buccale ou vaginale des animaux. L'injection sous-cutanée a provoqué, dans un cas, un petit abcès contenant de rares microcoques. Raoul et Thiry ont échoué également dans leurs essais d'inoculation.

Examen de la fausse membrane. — La lésion produite par le bacille fusiforme, seul ou associé à divers microbes favorisants, tels que le spirille, est essentiellement un processus de nécrose. Des coupes de la fausse membrane dans un cas d'angine à bacille pur ont été pratiquées. Après collage, les coupes ont été colorées pendant quinze minutes à l'aide de la thionine phéniquée, puis traitées pendant quelques secondes par la glycérine acétique à 1/200, lavées soigneusement à l'eau, puis montées

1. Freyche. Etudes sur l'angine diphtéroïde et ulcér. à bac fusiformes de Vincent. *Thèse de Toulouse*, 1899, p. 49. D'autres bactéries, telles que le streptocoque, le *Bac. Coli* peuvent, du reste, jouer un rôle dans la formation des fausses membranes à la surface des syphilides diphtéroïdes (Boulloche, Hudelo et Bourges).

dans le baume d'après les procédés habituels. La double coloration a été obtenue par l'éosine en solution aqueuse. La solution alcoolique d'aurantia peut être employée à la place de la glycérine acétique. et constitue un excellent moyen de différenciation.

Dans les préparations ainsi colorées, on voit, à un faible grossissement, trois zones bien distinctes. La plus superficielle est constituée par la portion nécrosée de la fausse membrane. Elle est d'une teinte bleu verdâtre très pâle, et pauvre en éléments cellulaires. C'est à peine si l'on voit çà et là quelques noyaux libres. à contours irréguliers, ayant pris un peu mieux la coloration. Le picrocarmin colore cette couche en jaune pâle.

La zone intermédiaire (*b*), dans les coupes traitées par la thionine, contraste avec la précédente par sa coloration bleue très vive. Elle est constituée, en effet, tout entière, par des amas considérables de bacilles fusiformes étroitement tassés, formant une sorte de haie compacte et sinueuse d'où partent perpendiculairement de petits prolongements qui s'engagent dans l'épaisseur de la muqueuse.

La couche la plus profonde de la fausse membrane (*c*) est plus riche en éléments cellulaires. Néanmoins les noyaux de ces cellules sont altérés, leurs bords sont déchiquetés. Ils ne présentent aucune trace de multiplication. Leur nucléole a disparu ; leur chromatine s'est, en partie, diffusée dans le protoplasma cellulaire. Dans les préparations traitées par la méthode de Weigert, on aperçoit, dans cette zone, une structure aréolaire fibrineuse très nette, analogue à celle de la fausse membrane diphtérique. Il n'est pas sans intérêt de constater que des microbes pathogènes si différents, le bacille de la diphtérie et le bacille fusiforme, déterminent, à la surface de la muqueuse pharyngée, des altérations histologiques semblables.

A un grossissement suffisant, on voit que les bacilles sont répartis d'une manière assez inégale dans l'épaisseur de la fausse membrane. A la surface de celle-ci, ils sont assez abondants, mais mélangés à un grand nombre de microbes étrangers et, en particulier, de cocci (*fig.* 2, *a*). C'est dans le district sous-jacent que la prolifération du bacille est la plus active. Les bacilles y forment, en effet, un banc tellement touffu qu'il est impossible de les discerner isolément (*b*). Dans la couche la plus profonde (*c*), ils deviennent, au contraire, moins nombreux et sont facile-

ment reconnaissables. En cette région, ils sont à l'état pur. Aucun microbe ne leur est associé, sauf dans certaines coupes où l'on voit de petits nids de microcoques accompagnant les traînées bacillaires.



Fig. 2. — Angine à bacilles fusiformes. Forme pure. Coupe de la fausse membrane.

La double coloration, par le procédé de Gram et la fuchsine, montre, du reste, à la surface de la coupe, les microbes étrangers colorés en violet, à côté des bacilles fusiformes qui ont pris la coloration rouge. Dans la profondeur, soit au niveau de la couche active de prolifération des bacilles, soit dans le territoire sous-jacent, les bacilles apparaissent seuls, groupés en traînées

compactes ou éparpillés au milieu des tissus mal colorés et partiellement nécrosés.

III

En terminant l'étude de l'angine à bacilles fusiformes, il paraît utile de faire ressortir les analogies qui existent, au double point de vue clinique et bactériologique, entre cette maladie et une autre affection heureusement à peu près disparue, aujourd'hui, du domaine de la chirurgie : je veux parler de la diphtérie des plaies ou pourriture d'hôpital. L'une et l'autre de ces deux affections est caractérisée par une production néomembraneuse. Remarquons cependant que l'angine diphtéroïde s'accompagne presque toujours d'adénite, alors que, dans la diphtérie des plaies, les ganglions lymphatiques correspondant à la lésion ne sont pas tuméfiés. Sauf cette différence clinique, l'analogie des deux affections se poursuit jusque dans l'aspect des deux bacilles qui présentent à peu près les mêmes dimensions, la même forme renflée légèrement au centre avec extrémités amincies ; qui se décolorent également par la méthode de Gram ; qui ne sont cultivables ni l'un ni l'autre ; enfin qui, dans les deux affections, se montrent très fréquemment associés à un fin spirille [1].

S'agit-il, dès lors, d'une seule et même affection localisée ici, au niveau du pharynx, là, à la surface d'une plaie accidentelle ou chirurgicale ? On ne saurait l'affirmer, attendu que, jusqu'à présent, malgré de nombreuses tentatives, les deux bacilles n'ont pu être cultivés. Cet élément important de comparaison nous fait donc absolument défaut. Mais il est plausible de penser que ces deux microbes sont probablement très voisins.

1. H. Vincent, *loc cit.*

BIBLIOGRAPHIE

H. Vincent. Sur l'étiol. et sur les lésions anatomo-pathologiques de la pourriture d'hôpital. (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, p. 492, 189.6)

H. Vincent. Sur une forme particulière d'angine diphtéroïde (angine à bacilles fusiformes. (*Société Médic. des Hôp.*, 17 mars 1898.)

Id. Nouvelles recherches sur l'angine diphtéroïde à bac. fusiformes. (*Ibid.*, 12 janv. 1899.)

Bernheim. Ueber einen bakteriol. Befund bei Stomatitis ulcerosa. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.*, nos 5, 6, p. 177, 11 févr. 1898.)

G. H. Lemoine. Angine ulcéro-membr. à bac. fusiformes et spirilles. (*Soc. méd. des Hôp.*, 24 mars 1898.)

Raoult et Thiry. Amygdalites ulcéro-membr. avec spirilles et b. fusiformes de Vincent. (*Congrès de laryng.* Paris, mai 1898.)

Dopter. Angine à bac. fusiformes de V. (*Presse Médic.*, 10 août 1898.)

Bernheim et Pospischill. Etude clin. et bact. de la stomatite ulcéreuse. (*Jahr. f. Kinderheilk.*, 1898, *Bd.* 46.)

Abel. Bactériol. de la stomat. et de l'ang. ulcéreuse. (*Centralbl. f. Batker. u. Parasitenk.*, 15 juill. 1898.)

De Stœcklin. Contrib. à l'étiol. des angines ulcéro-membr. (*Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.*, 4 nov. 1898.)

Rispal. Ang. diphtéroïde à b. fusiformes et spirilles. (*Soc. de méd. de Toulouse.* 11 nov. 1898.)

Sacquépée. Cinq cas d'ang. à spirilles et b. fusiformes de Vincent. (*Bull. et mémoires de la Soc. méd. des Hôp.*, 19 janv. 1899, p. 41.)

Ch. Nicolle. Ang. ulcéro-membr. à bac. fusif. et spirilles (angine de Vincent). (*Mémoires et trav. du Labor. de Bactér. de l'Ecole de Méd. de Rouen.* Rouen, 1899.)

Lichtwitz et Sabrazès. Bac. fusiformes de V. dans un cas d'amygdalite ulcér. et dans deux cas de suppur. péribuc. (*Arch. intern. de Laryngol*, XII, no 2, 1899, p. 134.)

G. Schneider. Angine à bacilles fusiformes de Vincent, *Presse médic.* 17 juin 1899.

J. Freyche. Etudes sur l'Angine diphtérique et ulcéreuse de Vincent, *Thèse de Toulouse*, 1899.

NOTE SUR UN BACILLE DES VOIES RESPIRATOIRES

ET SES RAPPORTS AVEC LE BACILLE DE PFEIFFER

PAR M. LE Dr ELMASSIAN

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Au cours de recherches sur l'étiologie de la coqueluche, mon attention a été attirée sur un petit bacille fin, présentant avec le bacille de l'influenza, décrit par Pfeiffer, les plus grandes analogies et n'en différant que par sa culture sur les milieux au sérum (gélose-ascite, gélose-sérum, etc.), en l'absence d'hémoglobine. Pfeiffer [1] considère la présence d'hémoglobine comme indispensable au développement des colonies du bacille de l'influenza, et les nombreuses et rigoureuses expériences faites par lui pour le démontrer ne semblent laisser aucun doute à cet égard. Quant au « pseudo-influenza bacillus » dont la différenciation repose sur l'aspect morphologique, Pfeiffer est un peu moins explicite sur ses conditions de culture; il laisse entendre que le « pseudo-influenza bacillus » ne pousse que sur les milieux sanguins, mais il ne dit pas formellement qu'il ait spécialement recherché s'il se développe sur les milieux au sérum et sans hémoglobine, renvoyant d'ailleurs le lecteur à des recherches ultérieures qui n'ont pas encore paru.

Sur les 32 cas de coqueluche dont j'ai pu examiner l'expectoration bronchique, j'ai réussi 8 fois à isoler le petit bacille en question en culture pure, mais je m'empresse d'ajouter que je l'ai retrouvé dans des cas de bronchite aiguë, en dehors de la coqueluche, chez des adultes et chez des enfants, et que je ne songe pas à lui attribuer, jusqu'à plus ample informé, un rôle spécifique dans l'étiologie de la coqueluche ou de telle autre infection brochique aiguë.

N'étant pas à même de poursuivre actuellement l'étude systé-

1. PFEIFFER, *Zeitschrift f. Hyg.*, 1893. V. 13, p. 356.

matique des infections bronchiques infantiles ou autres, je désire seulement attirer l'attention sur ce bacille et sur les confusions auxquelles il peut donner lieu. En effet, depuis le mémoire de Pfeiffer, la plupart des auteurs qui ont recherché le bacille de l'influenza ont considéré comme tel tout bacille fin, ne prenant pas le Gram, et formant sur gélose sanguine de petites colonies transparentes et si fines que la loupe est le plus souvent nécessaire pour les reconnaître. Or, le bacille que nous étudions ne peut être différencié morphologiquement du bacille de l'influenza, et il donne sur gélose sanguine des colonies absolument identiques à celles du bacille de Pfeiffer. Comme lui il ne se développe pas sur les milieux ordinaires non additionnés de sang. Il ne s'en distigue donc que par le seul fait de son développement facile sur gélose-sérum sans hémoglobine. Ce caractère a-t-il l'importance absolue que Pfeiffer lui a attribué et suffit-il à lui seul à créer une différenciation? Pour trancher la question, il eût été nécessaire d'étudier parallèlement un certain nombre de races de bacille de Pfeiffer, isolés de cas d'influenza typiques.

L'épidémie d'infections broncho-pulmonaires qui a sévi à Paris cette année, et que les cliniciens désignent par le terme vague de grippe, semblait devoir fournir les matériaux nécessaires à cette étude. Nous avons pu étudier, dans de bonnes conditions, l'expectoration de 6 malades. Trois fois il nous a été impossible de déceler dans la secrétion bronchique, tant par la culture que par l'examen microscopique, la présence du bacille de Pfeiffer ou de notre bacille.

Dans 3 cas observés dans une même famille, nous avons isolé, sur gélose sanguine comme d'ailleurs sur gélose sérum, un bacille qu'il nous a été impossible de différencier de celui que nous étudions et qui, repiqué de la gélose sanguine sur gélose sérum, a poussé aussi facilement sur l'un comme sur l'autre milieu. Par tous ses caractères, il correspond au bacille de Pfeiffer, avec cette différence qu'il peut se développer en l'absence d'hémoglobine. Or, c'est là le seul caractère qui différencie aussi le bacille que nous avons étudié du bacille de Pfeiffer.

Grâce à l'obligeance M. Dujardin-Beaumetz, nous avons pu étudier un bacille isolé par le Dr Meunier [1], dans une broncho-

1. Meunier, 10 cas de broncho-pneumonie due au bacille de Pfeiffer. *Archiv. gén. de méd.* Février et mars 1897.

pneumonie chez un enfant, et que cet auteur avait considéré comme étant du bacille de l'influenza de Pfeiffer. Ce bacille, conservé et cultivé sur gélose sanguine depuis deux ans, repiqué sur gélose sérum, a donné une culture en tous points semblable à celles de notre bacille, et tous ses caractères l'identifient complètement avec lui.

Le Dr Dujardin-Beaumetz réussit à prolonger considérablement la vitalité du bacille de l'influenza en l'ensemençant dans des sacs en collodion, qu'il mit ensuite inclus dans la cavité péritonéale de cobayes. Dans ces conditions, et malgré l'absence d'hémoglobine, le développement du bacille de Pfeiffer est considérable, et on le retrouve encore vivant plusieurs mois après l'ensemencement.

On le voit, la question semble fort complexe, et comme le contrôle expérimental sur les animaux n'est pas possible, puisque le bacille de Pfeiffer comme notre bacille n'est pas infectant pour les espèces animales autres que l'espèce humaine, l'observation clinique, complétée par l'investigation bactériologique, nous semble seule en état de dissiper ces obscurités.

La pathologie des voies respiratoires doit être dégagée des conceptions anatomiques et ramenée à la notion des infections. Mais il faut le reconnaître, le terrain est encore peu préparé et les difficultés sont nombreuses. Le nombre des mémoires publiés en ces dernières années sur la bactériologie de la coqueluche est très respectable, mais les résultats de ces recherches sont peu concordants, et il ne s'en dégage aucune indication précise. C'est que chaque auteur est préoccupé de voir, dans le microbe isolé par lui, le bacille spécifique de la coqueluche, alors que rien ne justifie pareille conclusion.

Nous décrirons donc, d'une manière aussi brève et aussi précise que possible, le petit bacille que nous avons si fréquemment isolé de la sécrétion bronchique d'enfants ou d'adultes atteints d'affections broncho-pulmonaires aiguës, et ne pouvant trancher la question à l'heure actuelle, nous nous abstiendrons de préjuger en aucune manière son rôle dans ces diverses inflammations.

Nos premiers examens ont donc porté sur la sécrétion bronchique d'enfants atteints de coqueluche. Après avoir lavé le crachat dans de l'eau stérile pour le débarrasser du mucus et

des microbes dont il a pu se charger pendant son trajet au travers de la bronche, nous en prélevons une partie pour l'examen microscopique, et une autre pour la culture.

Les préparations microscopiques, étalées et fixées suivant les procédés habituels, étaient colorées par la fuschine de Ziehl diluée et le bleu de méthylène phéniqué pendant des temps variables.

Dans toute une série de cas, chez des malades du pavillon de l'hôpital Trousseau, l'espèce microbienne qui nous avait semblé la plus constante, et qui pour cette raison avait fixé notre attention, était représentée par un petit bacille fin, siégeant le plus souvent en dehors des leucocytes, et formant parfois des amas irréguliers, rappelant ceux de la septicémie des souris ou du bacille de Weeks, de la conjonctivite aiguë contagieuse.

Ce bacille se colore assez difficilement : avec les solutions de fuchsine de Ziehl, étendues et chauffées à 60°, on arrive à le mettre en évidence, mais il ne prend jamais la couleur d'une manière très intense.

Néanmoins, nous avons rencontré des cas où, malgré une recherche attentive et l'examen d'un grand nombre de préparations, ce bacille fin faisait défaut. Ce fait, joint à la constatation du bacille dans d'autres infections bronchiques, nous avait d'ailleurs porté à écarter toute idée de relation étiologique entre ce bacille et la coqueluche.

Comme dimension moyenne, ce bacille se rapproche du bacille de Weeks. Il est un peu plus épais et présente souvent un très léger étranglement transversal et médian. En outre ses extrémités sont effilées ou arrondies, et ne paraissent jamais rectangulaire. Certains éléments sont nettement bacillaires, d'autres rappellent en beaucoup plus petit les formes allongées du bacille pneumonique. Ce petit bacille s'en distingue plus aisément par le fait qu'il se décolore par la méthode de Gram.

Pour l'étude de la sécrétion bronchique par la culture, nous avons procédé de la manière suivante. Nous avons pris de larges tubes de 3 à 4 centimètres de diamètre dans lesquels nous avons préparé le mélange de gélose avec une sérosité pathologique (sérosité de kyste ovarien, d'ascite ou d'épanchement pleural). Ces tubes étaient préparés suivant la méthode habituelle. Nous mettions tout d'abord 6 c. c. de gélose ordinaire à 2 0/0 de peptone

neutralisée. Nous stérilisions à l'autoclave : puis, pendant le refroidissement, lorsque la température de la gélose est comprise entre 70° et 50°, on introduit 3 c. c. de sérosité stérile. On opère le mélange par quelques mouvements imprimés aux tubes et on laisse la solidification se faire, en inclinant le tube pour avoir une grande surface. On s'assure de la stérilité en plaçant les tubes 24 à 48 heures à l'étuve avant de s'en servir. L'emploi des tubes nous a paru préférable à l'emploi de boîtes de Petri, car les chances de contamination par les microbes de l'air sont moins grandes, alors que la surface utilisable de gélose sérum est tout aussi considérable.

Voici maintenant comment nous obtînmes l'isolement de notre bacille. Après avoir lavé les crachats suivant la méthode de Koch, et ainsi que nous l'avons dit plus haut, nous en prélevions une petite quantité avec la spatule de platine que nous promenions ensuite à la surface de 6, 8 ou 10 tubes sans reprendre de la sécrétion. Ces tubes sont placés à l'étuve, à 37°.

Après 24 heures, les 3 ou 4 premiers tubes sont si chargés de colonies diverses qu'il n'est pas possible de les utiliser, mais à partir du 4e ou 5e tube, le nombre des colonies apparentes devient très faible. Si l'on examine la surface de la gélose avec une loupe de 15 dioptries, on constate un nombre considérable de petites colonies circulaires, transparentes, faisant une très faible saillie, et presque imperceptibles à l'examen direct. Dans le cas où le bacille en question était abondant dans les sécrétions bronchiques, nous avons été souvent surpris de voir qu'à partir du 5e tube aucun développement ne paraissait, à un premier examen, s'être produit, alors que l'examen à la loupe révélait des colonies confluentes et quasi pures du bacille en question. Dans tous les cas il était facile de faire un repiquage de colonies isolées à partir du 4e, 5e tube, et d'obtenir, par conséquent, des cultures pures.

Examinées au microscope, les colonies développées à la surface de la gélose-sérum affectent une forme régulièrement arrondie et faiblement convexe. Les contours sont assez nets, la colonie est incolore, transparente, et présente un aspect très faiblement granuleux. Ces colonies n'ont pas de noyaux et leur diamètre ne dépasse pas de 1/4 à 1/2 millimètre. Cependant, lorsqu'elles sont très éloignées les unes des autres, leur diamètre

peut atteindre le double après 2-3 jours de séjour à l'étuve. Etalée en frottis sur une lame et colorée par la fuchsine diluée, la colonie se montre constituée par un bacille semblable à celui que nous avons décrit, et les variations morphologiques, suivant l'âge de la culture, ne portent que sur la longueur, la coloration uniforme ou au contraire prédominante aux extrémités du bacille. Après un certain nombre de repiquages, il arrive que les bacilles, tout en conservant leur diamètre transversal, deviennent un peu plus allongés, mais sans jamais atteindre plus du double en longueur de la dimension primitive.

Le bacille qui nous occupe se cultive exclusivement sur les milieux additionnés de sérosités humaines ou animales. Dans le bouillon peptoné ordinaire, dans la gélatine, sur la gélose peptonée simple et sur les milieux végétaux, nous n'avons jamais vu se produire le moindre développement.

Par contre, si l'on additionne la gélose ou le bouillon peptoné ordinaire d'une sérosité pathologique humaine, ou encore de sérum de lapin ou de cobaye, on obtient une prolifération abondante. Le sérum de cheval, par contre, ne nous a pas paru se prêter à la culture de notre bacille.

Dans les milieux liquides (bouillon sérum), la culture ne devient apparente qu'après 48 heures d'étuve à 37°, et cependant après 24 heures déjà les bacilles sont très abondamment multipliés dans le liquide, ainsi que le prouve l'examen direct ou l'ensemencement sur milieu solide. Après 48 heures, on constate un trouble uniforme communiquant au liquide, lorsqu'on l'agite, un aspect moiré. Ce trouble augmente un peu les 3 premiers jours, puis il reste stationnaire, et insensiblement les microbes se déposent au fond du vase, tandis que le liquide s'éclaircit.

La culture reste vivante pendant 8-10 jours si le ballon est maintenu à une température supérieure à 30°. Les cultures développées ne conservent que fort peu de temps leur vitalité à la température ordinaire, et il est le plus souvent impossible de repiquer une culture qui a séjourné 24 heures à la température du laboratoire. Le bacille est également peu résistant aux temtempératures supérieures à 45°. A cette température de 45°, il résiste encore un quart d'heure ou vingt minutes, mais à 58° il est rapidement tué.

Pour le conserver et éviter des repiquages tous les 4 ou 5 jours

comme on est obligé de faire avec des cultures en surface sur gélose-sérum, le mieux est de l'ensemencer en piqûre dans de la gélose-sérum et de laisser les tubes à l'étuve. Le développement se produit surtout dans les couches superficielles de la gélose-sérum, et l'on peut faire des repiquages 15 jours ou même 3 semaines après l'ensemencement.

Nous avons inoculé notre bacille aux différentes espèces d'animaux de laboratoire (lapin, cobaye, pigeon, souris). L'inoculation intraveineuse de doses assez considérables de culture en milieu liquide ne provoque chez le lapin aucun phénomène morbide. Si la dose dépasse 10 c. c. il se produit parfois une cachexie lente, mais jamais on ne retrouve dans les humeurs ou les tissus de l'animal, le microbe inoculé. Le pigeon et la souris ne réagissent en aucune manière à l'inoculation.

Le jeune cobaye est le seul animal chez lequel nous ayons obtenu une réaction expérimentale, à la condition toutefois d'inoculer la culture dans la cavité péritonéale.

Si l'on injecte, dans le péritoine d'un cobaye de 200 grammes, 2 à 4 c. c. d'une culture en bouillon sérum de 48 heures, l'animal succombe le plus souvent en moins de 24 heures; l'abdomen est tendu, douloureux. L'animal reste immobile. Sa température s'élève rapidement de 4 à 5° dès la première heure qui suit l'injection. A l'autopsie, on constate une péritonite généralisée, caractérisée par une teinte rosée de la séreuse, et par la présence d'un exsudat séro-fibrineux plus ou moins abondant. Au niveau de la face convexe du foie, on voit souvent une exsudation abondante, formant un revêtement gris jaunâtre continu.

L'exsudat est constitué par des filaments de fibrine et par de nombreux leucocytes mono et polynucléaires. Les bacilles sont nettement multipliés et existent aussi bien entre les cellules que dans le protoplasma des phagocytes.

On observe également un exsudat séreux pleural et péricardique renfermant moins de leucocytes que l'exsudat péritonéal, et contenant quelques bacilles, mis en évidence par l'examen microscopique. On cultive facilement le bacille de l'exsudat péritonéal et de l'exsudat pleural, et l'ensemencement du sang du cœur donne le plus souvent des colonies assez nombreuses du bacille inoculé.

Il n'est pas possible de faire d'inoculation en série sans

recourir à la culture. L'exsudat péritonéal inoculé à un cobaye jeune ne provoque aucune réaction manifeste.

Cette péritonite expérimentale n'a rien de caractéristique. Elle ne diffère guère de celle qu'on provoque avec le bacille typhique, avec le vibrion cholérique, le gonocoque, etc.

A ce point de vue encore, la différenciation n'est pas possible, car les expériences de Turner et Kolle, faites avec le bacille de l'influenza sur les jeunes cobayes, ont donné des résultats identiques, et l'on peut considérer cette péritonite expérimentale comme dépourvue de toute valeur de différenciation.

Disons en terminant que le bacille que nous venons de décrire n'a rien de commun avec ceux auxquels Ritter[1], Affanasieff[2], Koplik[3], Czaplewsky[4], Zusch[5], Livio Vincenzi[6], W. Buttermilch[7], etc., ont attribué un rôle étiologique dans la coqueluche. Tous ont décrit des bacilles qui se cultivent facilement sur les milieux ordinaires en prenant le Gram, et qui, par ces caractères mêmes, diffèrent complètement de notre bacille.

En somme, le point sur lequel nous voulons appeler l'attention des cliniciens et des bactériologistes est le suivant : nous avons isolé dans l'expectoration d'enfants ou d'adultes atteints de maladies différentes (coqueluche, tuberculose pulmonaire, pneumonie) un bacille en tous points identique à celui que nous avons rencontré dans 3 cas sur 6 d'infection bronchique grippale rentrant cliniquement dans le type influenza.

Le bacille isolé présente tous les caractères assignés par Pfeiffer au bacille de l'influenza, mais il se développe aussi bien sur les milieux au sérum (gélose-ascite ou gélose-sérum) que sur les milieux exsangues : par contre, jamais nous n'avons obtenu de développement sur la gélose peptonée ordinaire.

Dans les sécrétions bronchiques de ces différents malades, un fait est à remarquer, c'est que le bacille en question ne semble pas un hôte absolument constant, et que son abondance est très

1. Ritter. — *Berl. Klin. Woch.* 1892, p. 1276; *Idem.* 1876, n° 47, p. 1040-43, et n° 48, p. 1069-71.
2. Affanasieff. — Saint-Pétersbourg. *Med. Woch.* 1887, nos 39-42.
3. Koplik. — *Cent. f. Bact.* 1897, Band. XXII p. 222.
4. Czaplewsky et Heusel. — 1er mémoire, *Centrab. f. Bact.* 1897, Band. XXII, p. 641 — 2e mémoire, *Idem.* 1898, Band. XXIV, p. 865.
5. Zusch. — *Cent. f. Bact.* 1898, Band. XXIX, p. 721. — *Idem.* 1898, Band. XXIV, p. 769.
6. Livio Vincenzi. — *Deut. med. Woch.* 1898, n° 40, p. 631.
7. W. Butter-milch. — *Berl. Klin. Woch.* 1899, n° 17, p. 367.

variable. Tantôt il existe en si grand nombre qu'à l'examen microscopique on n'hésiterait pas à lui attribuer le rôle pathogène, tantôt au contraire on a peine à le reconnaître au milieu des autres espèces microbiennes, et la culture seule permet de rendre sa présence évidente.

S'agit-il d'un saprophyte pur des voies respiratoires? S'agit-il au contraire d'un organisme semblable au pneumocoque et pouvant être tour à tour saprophyte ou pathogène? Nous savons, en effet, que le pneumocoque peut persister à l'état saprophytique dans les cavités buccales ou nasales de l'homme sain, qu'il peut provoquer des infections pulmonaires aiguës et même des épidémies de bronchite, de méningite ou de conjonctivite. Entre le pneumocoque saprophyte et le pneumocoque des épidémies de méningite, le bactériologiste ne peut établir aucune distinction évidente et indiscutable, et tandis que l'expérimentation sur l'animal ne lui apporte au point de vue de la différenciation que des données insuffisantes, les effets que l'observation clinique permet de constater sont bien souvent très différents.

Nous pensons que le bacille de Pfeiffer, dont le rôle dans l'influenza n'est que très vraisemblable et ne peut être considéré comme prouvé, appartient à une espèce microbienne dont l'existence saprophytique sur les muqueuses des voies respiratoire et comparable à celle du pneumocoque. Ce microbe se multiplie et peut devenir pathogène au cours d'autres infections bronchopulmonaires (pneumonie, coqueluche, etc.) et ainsi s'expliqueraient les constatations que nous avons pu faire.

SUR LA PRÉSENCE D'AGGLUTININES SPÉCIFIQUES

dans les cultures microbiennes[1].

Par M. le Dr E. MALVOZ.

Dans un précédent travail[2], j'ai montré que l'agglutination des microbes n'était pas une propriété spéciale des sérums spécifiques, comme on l'avait pensé d'abord, mais que ce phénomène pouvait être provoqué par des substances chimiques beaucoup moins complexes, au premier rang desquelles se plaçaient la formaline, le sublimé, des matières colorantes telles que la safranine et la vésuvine.

Depuis la publication de ce travail, la liste des substances, que j'ai reconnues comme douées de propriétés agglutinantes, s'est beaucoup allongée : je signalerai en particulier la fuchsine en solution aqueuse bien filtrée, et les acides acétique et lactique dilués[3].

Pour étudier l'agglutination, je me sers maintenant, au lieu du bacille typhique, d'un microbe beaucoup plus facile à observer et qui est très sensible aux agglutinines, le premier vaccin du charbon. Il n'est pas difficile avec quelque habitude, en délayant une anse de culture sur gélose de 1er vaccin dans un peu d'eau distillée, d'obtenir de belles émulsions montrant des bâtonnets, avec leur légère mobilité, bien isolés les uns des autres. On rejette les

1. Le présent travail a été adressé à la rédaction des *Annales* en février 1899. C'est à cause de l'encombrement de la publication qu'il n'a pu paraître plus tôt.

2. Sur l'agglutination des bacilles typhiques par des substances chimiques. *Annales Pasteur* 1897.

3. Nous avons été mis sur la voie de la découverte des propriétés agglutinantes très curieuses de l'acide acétique dilué par une circonstance bizarre, qui porte son enseignement au sujet des causes d'erreur en matière de séro-diagnostic. On nous avait envoyé du sang pour l'épreuve de Widal, et nous trouvions que son sérum agglutinait le bacille typhique même à 1 p. 5000! C'était, à n'en pas douter, une vraie fièvre typhoïde. Or, nous apprîmes qu'il s'agissait de sang normal. Après bien des questions et des recherches, il fut reconnu enfin que l'expéditeur avait rincé au vinaigre, pour le nettoyer, le petit tube où le sang avait été recueilli!

émulsions montrant par-ci par-là des paquets de bacilles ayant échappé à la dissociation.

C'est ce microbe atténué du charbon qui est particulièrement sensible à l'action de l'acide acétique dilué : tandis que le même acide concentré rapetisse simplement les bacilles sans les réunir en amas, l'acide produit de très belles agglutinations, même à des dilutions de 1 p. 2000 et davantage. L'acide lactique agit de même. On ne voit pas au microscope de coagulum englobant les microbes; ceux-ci semblent englobés dans un précipité formé en dehors d'eux. Nous ignorons encore le mécanisme intime de l'agglutination, aussi bien par les sérums que par nos substances chimiques, et quelles sont les causes qui rapprochent les uns des autres des microbes primitivement séparés.

*
* *

La présence de substances agglutinantes spécifiques dans le sang des sujets infectés est généralement attribuée à des réactions de l'organisme : sous l'influence des microbes ou de leurs produits, il y aurait, ou bien production en excès de substances déjà élaborées à l'état physiologique, ou bien secrétion de produits nouveaux, doués de propriétés agglutinantes.

Mes recherches me semblent devoir faire envisager la question d'une autre façon : il n'est pas nécessaire, me paraît-il, d'invoquer l'existence de sécrétions normales ou pathologiques dues, soit à l'infection elle-même, soit aux processus cellulaires de l'immunisation,pour expliquer l'action agglutinante des sérums. On peut retrouver, dans les cultures mêmes des microbes, tout au moins en ce qui concerne le charbon, des agglutinines spécifiques : celles-ci, ajoutées à des émulsions neuves, y produisent des amas de bacilles, qui ne diffèrent pas de ceux obtenus au moyen du sérum.

On savait déjà que certains microbes, en proliférant dans les cultures liquides, ne restent pas isolés, mais se présentent en flocons plus ou moins volumineux : tel est le cas pour les microbes du charbon virulent, du rouget, de la diphtérie etc. Les cultures du bacille typhique lui-même, en bouillon ordinaire, présentent assez souvent de petits amas microbiens. Ces faits sont bien connus de tous ceux qui s'occupent de séro-diagnostic, et on recommande notamment, pour l'épreuve de Widal, de se

servir de cultures en eau peptone (Courmont), qui montrent généralement des bacilles bien isolés.

Ces agglutinations spontanées sont appelées des *pseudo-amas*, et on les a toujours différenciées, je ne sais pourquoi, des groupements bacillaires produits par l'action des sérums.

Quoi qu'il en soit de ces distinctions, les faits suivants prouvent, me paraît-il, l'existence d'agglutinines spécifiques dans les cultures.

Prenons une émulsion de premier vaccin charbonneux préparée en broyant, dans un demi-centimètre cube d'eau distillée, une anse de culture sur gélose restée six jours à 22°. On dépose sur porte-objet une anse de l'émulsion, on s'assure que les bacilles sont mobiles et bien isolés les uns des autres. La préparation peut être abandonnée plusieurs heures en chambre humide, sans que des agglutinations se produisent entre les bacilles. L'addition d'eau ordinaire, d'eau salée à 1-3-5 0/0, laisse les microbes parfaitement isolés, même après plusieurs heures.

Mais si on mélange sur le porte-objet, à une anse d'émulsion, la même proportion de bouillon ordinaire (alcalin), on voit les bacilles perdre leur faible mobilité, puis se rapprocher, se souder en groupes composés de 3-5-10 bacilles.

Le résultat est le même si on emploie de la gélatine en feuille additionnée de 10 parties d'eau distillée : les préparations sont maintenues liquides à 37°; la gélatine se comporte donc comme le ferait du sérum spécifique dilué.

Enfin, le phénomène de l'agglutination devient très net si on se sert, non plus d'un bouillon vierge, *mais d'un bouillon dans lequel a proliféré le bacille du charbon lui-même*, et que l'on a débarrassé des microbes au moyen de l'appareil centrifugeur. On prend une anse de cette culture centrifugée, on s'assure qu'elle ne renferme pas de bacilles. On la mélange intimement sur porte-objet à une anse d'émulsion de vaccin, on abandonne en chambre humide. Bientôt, on voit apparaître au microscope des amas de 10-15-20 microbes et même davantage; à un moment donné, il reste peu de bacilles libres dans la préparation. Le sérum normal du cheval, qui est doué d'un certain pouvoir agglutinant, ne provoque pas d'amas plus considérables ni différents d'aspect des premiers.

Les cultures de charbon, qui m'ont donné l'agglutination la

plus nette, avaient été obtenues par M. Lambotte, mon assistant, en soumettant des bouillons ensemencés de *bacillus anthracis* à une agitation continue, au moyen de l'appareil Herman[1]; particularité très curieuse, les liquides ainsi agités plusieurs jours deviennent, après quelques passages, d'une viscosité très grande, dont nous ne connaissons pas encore la raison. Non seulement les bacilles du vaccin, traités par une culture centrifugée de charbon, se groupent en amas, mais on distingue, dans les corps microbiens, ces sortes de vacuolisations qui s'observent souvent par l'addition des sérums spécifiques. On ne parvient pas à distinguer un coagulum ou un précipité englobant les bacilles.

Si, au lieu de vaccin charbonneux, on emploie une émulsion de *bacterium coli* ou de *b. typhosus*, on ne parvient pas à provoquer l'agglutination de ces microbes.

Dilué au quart, le liquide charbonneux agglutine encore, mais plus faiblement, les émulsions de vaccin.

On sait que le phénomène de l'agglutination peut être étudié d'une autre façon qu'en se servant d'émulsions microbiennes auxquelles on ajoute du sérum. Il est possible de faire l'observation à l'état *naissant*, en ajoutant à un milieu de culture liquide, en goutte pendante par exemple, une trace de sérum spécifique; on ensemence avec quelques microbes seulement, on abandonne à une température convenable, en même temps que des préparations témoins non additionnées de sérum. Dans ces conditions, on assiste à la pullulation microbienne accompagnée de l'agglutination, là où l'on a ajouté le sérum.

Ensemençons de la même façon du vaccin charbonneux, quelques microbes seulement, en goutte pendante : des préparations seront faites en eau peptone (peptone de Witte), d'autres en bouillon ordinaire, en gélatine nutritive (maintenue à 37°), et enfin en culture charbonneuse centrifugée. En eau peptone, la plupart des bacilles restent séparés les uns des autres, en se multipliant. Ce n'est qu'après un certain temps qu'ils se réunissent en petits amas; dans les autres milieux, au contraire, les préparations se présentent, après 24 à 36 heures, comme s'il s'agissait de milieux additionnés d'un peu de sérum spécifique : les bacilles sont groupés en flocons, surtout considérables dans

1. *Centralblatt für Bakteriologie*. Bd. VII, n° 2.

les cultures en liquide charbonneux centrifugé. Il ne s'agissait nullement d'une prolifération de microbes du charbon, ayant échappé à la centrifugation : des préparations témoins faites avec le liquide sont restées stériles; d'ailleurs, les caractères du premier vaccin étaient très reconnaissables.

Mais si on ensemence du *bacterium coli* dans une goutte pendante de liquide charbonneux, on voit aussi les bacilles proliférer en s'agglutinant. Où est, dans ce cas, la spécificité? Celle-ci se manifeste si, au lieu d'employer la culture centrifugée de charbon telle quelle, on la dilue au dixième. Une goutte pendante de cette dilution, ensemencée de *b. coli*, ne montre pas de microbes en amas, tandis que le vaccin du charbon y prolifère en bacilles entortillés et agglutinés, comme dans une culture additionnée de sérum spécifique.

* * *

Il faut donc bien admettre que les cultures de charbon renferment, à un moment donné, des agglutinines spécifiques, dont on peut faire apparaître les propriétés *in vitro* dans des milieux neufs. C'est surtout le liquide, débarrassé des microbes, d'une culture agitée, qui se montre chargé de ces substances douées du pouvoir de provoquer l'agglutination. Mais pourquoi le phénomène se produit-il aussi, à un plus faible degré, il est vrai, en mélangeant des bacilles pris sur gélose et émulsionnés dans l'eau, à du bouillon neuf, à de la gélatine liquéfiée, à du sérum normal? Il faut bien admettre que les bacilles apportent avec eux des produits, dont nous ne connaissons pas la nature, lesquels, en présence de certaines substances du bouillon, etc., amènent, soit la formation d'un coagulum englobant les microbes, soit une viscosité particulière des bâtonnets qui adhèrent ainsi les uns aux autres. On ne connaît pas bien le mécanisme de l'agglutination des microbes, comme des globules rouges, et ce travail n'a pas été fait pour résoudre cette question.

On remarquera que le bouillon, la gélatine liquéfiée, se comportent comme le sérum normal de certains animaux. Ne peut-on assimiler le phénomène à celui qui se produit après l'addition de fuchsine, par exemple? J'ai obtenu de très beaux amas de bacilles en ajoutant de la fuchsine, en solution aqueuse bien filtrée, aux émulsions : des flocons rougeâtres de microbes

adhérents se déposent et, après un certain temps, le liquide s'éclaircit complètement en se décolorant. Un sérum spécifique provoque des précipitations du même genre. Dira-t-on que la fuchsine est *agglutinante*? N'est-ce pas, au contraire, cette substance colloïdale, en solution toujours incomplète, qui se coagule et est véritablement *agglutinée* autour des bacilles entraînés dans le précipité? N'y a-t-il pas, dans le bouillon, la gélatine, le sérum normal, des substances colloïdales qui, en présence de certains produits apportés avec les microbes, se précipitent en plus ou moins grande abondance? On peut penser, *a priori*, que les phénomènes d'agglutination, en englobant les microbes eux-mêmes, sont très contingents et très étroitement liés à une foule de facteurs, tels que la qualité et la quantité des sels dissous, etc. On comprend ainsi que certains sérums normaux agglutinent beaucoup mieux que d'autres, et que des bacilles d'une espèce donnée soient plus sensibles au phénomène. Dans le mémoire qui suit, MM. Lambotte et Maréchal ont vu le sérum humain normal agglutiner le vaccin du charbon même à 1 p. 500, comme un véritable sérum spécifique!

Mais comment s'expliquer la propriété agglutinante si considérable du sérum des animaux immunisés? A notre avis, ce sont les inoculations répétées de produits microbiens qui surchargent le sang de ces mêmes substances qu'on retrouve dans les cultures, substances inconnues, mais qui, mises en présence des bacilles homologues, déterminent leur agglutination. Ces substances se condensent et se fixent peut-être dans le sérum. Un travail fait à notre laboratoire par M. Gengou et qu'on trouvera plus loin, sur l'agglutination dans le charbon inoculé au chien, a donné des résultats qui cadrent mal avec l'hypothèse d'un rôle actif de l'organisme dans la production des agglutinines. Moi-même, j'ai injecté une grande quantité de premier vaccin du charbon à des chiens; le sérum était déjà très agglutinant douze à quinze heures après l'injection, et, les jours suivants, le titre d'agglutination a diminué peu à peu. De plus, M. Gengou a constaté, aussi bien chez l'animal neuf que chez le chien soumis à de fortes injections de premier vaccin, que les divers organes, les exsudats leucocytaires, les globules blancs du sang, renfermaient infiniment moins d'agglutinines que le sérum. Toutes ces observations doivent nous faire

admettre qu'en ce qui concerne le charbon tout au moins, la propriété agglutinante du sérum n'est pas due à des réactions cellulaires, contrairement aux propriétés préventive ou anti-toxique : celles-ci, dans l'état actuel de nos connaissances, paraissent bien être le résultat d'une activité toute particulière des organes, sous l'influence des microbes ou de leurs produits.

1. Liège, Institut pathologique et bactériologique.

L'AGGLUTINATION DU BACILLE CHARBONNEUX

PAR LE SANG HUMAIN NORMAL

PAR MM. LAMBOTTE ET MARÉCHAL.

On connaît bien le pouvoir agglutinant du sang normal vis-à-vis de certains microbes. Mais, en général, pour constater cette propriété, il faut employer le sérum pur, ou très peu dilué. Si l'on dilue un peu fortement le sérum normal, jusque 1/50, 1/100 par exemple, le phénomène de l'agglutination des microbes ne se produit plus. On n'a guère signalé que deux exceptions à cette règle : certains sujets fournissent un sérum qui agglutine le *bacterium coli* parfois à des dilutions atteignant 1/100 et même davantage ; Bourges et Méry, d'autre part, disent avoir vu les bacilles de la morve s'agglutiner par le sang normal de cheval à une dilution de 1/200 au maximum, mais ils ne disent pas après combien de temps d'action des agglutinines. Si l'on met de côté ces faits, on peut dire, en thèse générale, qu'il n'y a vraiment que les sérums spécifiques, c'est-à-dire provenant d'animaux soumis à l'influence d'espèces bactériennes déterminées, qui, à des dilutions considérables, agglutinent le microbe correspondant, à l'exclusion des autres microorganismes. Un sérum qui agglutine, par exemple, le bacille typhique à des dilutions de 1/500 est considéré comme provenant d'un sujet sensibilisé par les produits du bacille d'Eberth, et ainsi de suite.

Nous venons de découvrir un sérum normal doué d'un pouvoir d'agglutination très considérable vis-à-vis d'une bactérie déterminée, sans qu'il puisse être question de l'action sur l'organisme des produits du microbe homologue : il s'agit du sérum humain, qui agglutine normalement, dans de nombreux cas, le bacille du charbon, et à des dilutions telles, qu'on pourrait considérer, dans ces cas, le sérum comme véritablement spécifique.

On sait que les bactéridies du charbon ne se prêtent pas à l'étude du phénomène de l'agglutination parce qu'elles sont presque toujours accolées les unes aux autres dans les cultures,

et que l'on ne peut préparer avec celles-ci des émulsions homogènes. Mais, au moyen du bacille du charbon atténué sous forme de premier vaccin, on prépare, avec un peu d'habitude, de belles émulsions de grands bacilles bien isolés, qui offrent un excellent *test-objet* pour l'étude de l'agglutination : on prend le dépôt d'une culture de deux jours sur gélose, et on l'émulsionne dans de l'eau distillée. Si à une anse de cette émulsion, déposée sur porte-objet, montrant des bacilles bien libres, on mélange une anse de sérum humain, pris chez les sujets les plus variés, on constate presque toujours une très forte agglutination, et ce, presque instantanément. Le sérum de certaines personnes provoque encore le phénomène, même quand on l'a dilué préalablement au 1/500.

Nos essais ont porté sur 41 personnes. Le sang était recueilli aseptiquement à la pulpe du doigt. Chez quatre sujets, tout à fait sains, adultes, dont un nègre, le sérum a agglutiné encore et instantanément à des dilutions respectives de 1/250, 1/150, 1/160 et 1/350. — Le *bacillus typhosus* et le *bacterium coli* n'étaient déjà plus agglutinés quand le sérum de ces personnes était dilué au 1/10.

Viennent ensuite sept observations de sujets tuberculeux des deux sexes, à divers stades de la maladie. Le titre maximum de l'agglutination du charbon a été de 1/150, 1/50, 1/200, 1/500, 1/100, 1/200 et 1/100. L'agglutination encore nette, et instantanée à 1/500, a été constatée chez une femme atteinte de tuberculose avancée. Le *bacterium coli*, le *bacillus typhosus*, et le bacille cholérique n'étaient plus agglutinés par ce sérum à 1/20.

Dans la fièvre typhoïde, à côté de la propriété agglutinante vis-à-vis du bacille d'Eberth, on peut très bien observer l'agglutination du charbon, et généralement pour des dilutions de sérum plus considérables que pour le bacille typhique. Nous possédons neuf observations de fièvre typhoïde à divers stades de la maladie, donnant les titres agglutinatifs suivants :

Vis-à-vis du *bacillus typhosus* : 1/60, 1/60, 1/50, 1/50, 1/80, 1/90, 1/60, 1/50 ;

Vis-à-vis du charbon : 1/300, 1/150, 1/250, 1/100, 1/50, 1/200, 1/100, 1/350.

Que l'on n'oublie pas que le titre est déterminé en fixant la dilution maxima au delà de laquelle on n'obtient plus d'aggluti-

nation *instantanée*. Si on laisse les réactifs en présence plusieurs heures, on arrive à des dilutions beaucoup plus considérables, tant pour le *typhosus* que pour le charbon.

Enfin, chez treize malades, atteints respectivement de saturnisme, d'ankylostomasie, de paralysie spastique, d'amygdalite suppurée, de pneumonie franche, de néphrite chronique, de rhumatisme chronique, d'entérite, d'ataxie locomotrice, de carcinome de l'estomac, de néphrite aigue, de chorée, de grippe, partout, on observa l'agglutination du charbon par le sérum aux titres maxima respectifs de : 1/300, 1/50, 1/250, 1/250, 1/100, 1/100, 1/150, 1/150, 1/150, 1/100, 1/50, 1/50 et 1/100.

Jamais nous n'avons observé une agglutination instantanée aussi considérable vis-àvis du *bacterium coli*, du bacille de Friedlander, du *bacillus typhosus* (en dehors des cas typhiques), du bacille de Sirault (van Ermengen).

Nous avons recherché si ce pouvoir agglutinant vis-à-vis du *bacillus anthracis* se retrouvait dans d'autres humeurs que le sérum. L'urine de quatre personnes, dont le sérum agglutinait encore à 1/200, n'agglutinait pas les bacilles du charbon, même à parties égales. Il en était de même de la sécrétion sudorale et des larmes provenant de ces mêmes personnes. Quant au lait, il s'est montré doué d'un léger pouvoir agglutinant, mais pas comparable à celui du sérum. Tandis que le sérum, chez quatre femmes, donnait la réaction agglutinante aux dilutions respectives de 1/50, 1/80, 1/50 et 1/100, le lait agglutinait à peine à 1/10.

Il était intéressant de s'assurer s'il existait une différence au point de vue de l'agglutination du charbon, entre le sérum de sang d'adulte et celui de nouveau-né. Nos observations ont porté sur le sang des quatre femmes précitées et sur celui de leurs nourrissons. Ceux-ci, âgés respectivement de 12 heures, un jour, trois jours et huit jours, nous ont fourni des sérums dont les taux agglutinatifs étaient de 1/50, 1/40, 1/60 et 1/50. Si l'on compare ces taux à ceux du sérum des mères de ces nourrissons, on peut conclure que le sang du nouveau-né se comporte vis-à-vis du charbon comme celui de l'adulte.

Les divers animaux (rat, cobaye, chien, chèvre, lapin, bœuf, cheval), dont le sérum a été vérifié, n'ont pas montré cette agglutination si considérable vis-à-vis du charbon. Le maximum a été

de 1/50. Le sérum spécifique d'un cheval de M. van de Velde, agglutinant le *bacillus typhosus* au cent-millième, n'agglutinait le charbon qu'au centième.

Quant à la répartition de la substance agglutinante dans l'organisme, nous l'avons étudiée sur le cadavre d'un homme de 16 ans, ayant succombé à une tuberculose (mal de Pott). Le sérum du sang du cœur agglutinait le charbon à 1/120. On a pris des morceaux de rate, de foie, de moelle osseuse, de rein, de corps thyroïde, de capsules surrénales, de pancréas, débarrassés le plus possible du sang. On a pris les mêmes poids de chacun, et divisé en deux parts : l'une a été triturée dans un mortier avec du quartz, l'autre a été soumise aux vapeurs d'éther, pour épuiser les tissus (Duclaux, tome II, p. 103). L'agglutination essayée avec les produits, convenablement filtrés, de ces manipulations s'est toujours montrée incomparablement moindre qu'avec le sérum du sang lui-même.

Il ne semble donc pas que, chez l'homme, les agglutinines du charbon s'élaborent dans les organes où se forment les lysines, les anticorps, etc.

Cette agglutination si considérable du bacille du charbon par le sang humain est un fait qui vient à l'encontre de la thèse (Nicolle, Dineur, etc.) qui attribue à l'appareil ciliaire une importance prépondérante dans le mécanisme de l'agglutination : le bacille du charbon n'a pas de cils.

Au point de vue pratique, il y aura lieu d'être prudent en matière de séro-diagnostic dans l'infection charbonneuse. Un bon travail de M. de Nobele, fait au laboratoire de M. van Ermengen, vient d'attirer l'attention sur l'importance du séro-diagnostic dans les accidents alimentaires, dus à certaines viandes. Le sérum d'un grand nombre de personnes, d'une localité du nom de Sirault, devenues malades à la suite de l'ingestion d'un pâté de viande, agglutinait fortement le microbe spécifique retrouvé dans celui-ci; ce microbe est dénommé bacille de Sirault. M. Hermann, à Mons, a constaté les mêmes faits. Supposons un instant que des accidents alimentaires soient imputés à l'ingestion d'une viande charbonneuse; on prend du *bacillus anthracis*, et on constate que le sérum des personnes malades agglutine celui-ci à des dilutions considérables : nul doute, semble-t-il, que le phénomène ne soit dû à la sensibilisation

de ces personnes par le microbe du charbon! S'il en était ainsi, presque toutes les observations publiées dans ce travail se rapporteraient à des accidents charbonneux.

Il y a donc lieu, quand il s'agit du charbon, d'être très prudent en matière de séro-diagnostic.

Liège, Institut bactériologique et clinique médicale, mai 1899.

Étude sur les rapports entre les agglutinines et les lysines DANS LE CHARBON

Par O. GENGOU

On ne possède pas encore d'étude systématique sur l'agglutination dans le charbon. Le seul travail qui, à notre connaissance, a donné quelques indications, tout à fait sommaires d'ailleurs, sur le pouvoir agglutinant d'animaux charbonneux est celui de Sawtchenko[1]. Ce savant a surtout étudié les pouvoirs bactéricide et préventif des animaux immunisés contre le charbon. Il n'est pas étonnant que cette étude n'ait pas été poursuivie aussi à fond que celle de l'agglutination dans la fièvre typhoïde, le choléra, etc. Le phénomène de l'agglutination d'un microbe donné ne peut être étudié qu'au moyen d'émulsions où les microbes se présentent bien isolés les uns des autres; or, on ne réussit pas à préparer des liquides où les bactéridies du charbon soient libres; les bâtonnets sont toujours plus ou moins accollés dans les cultures en bouillon et dans les émulsions préparées avec les dépôts sur gélose, sur gélatine, etc.

Heureusement, comme on l'a vu dans les mémoires précédents, on peut arriver à préparer de bonnes émulsions, convenables pour l'étude de l'agglutination du charbon, si l'on s'adresse, aux microbes du Ier vaccin charbonneux ; ces émulsions sont un excellent *test objet* pour l'étude de l'agglutination.

*
* *

On sait que le sang *normal* présente le pouvoir d'agglutiner à une concentration déterminée certains microbes ; *agit-il de même vis-à-vis du 1er vaccin du charbon?*

1. Sawtchenko : Contribution à l'étude de l'immunité, *Ann. Pasteur*. décembre 1897.

Nous avons vérifié, à ce point de vue, le sang d'un assez grand nombre d'animaux. Disons, une fois pour toutes, que la détermination du pouvoir agglutinant a toujours été faite de la façon suivante. On prend une culture de 2 jours, sur gélose à 22°, du 1er vaccin du charbon; on émulsionne une anse dans 1 c. c. d'eau distillée; on s'assure que les bacilles sont bien isolés, que l'émulsion ne présente pas d'amas spontanés. Dans un verre de montre, on dépose une goutte de sérum que l'on additionne de quantités croissantes d'eau distillée, ajoutée goutte par goutte; après chaque addition, on prend une anse de la dilution que l'on mélange sur porte-objet à une anse d'émulsion charbonneuse; on laisse la préparation 1/4 d'heure en chambre humide [1], à la température du laboratoire, en même temps que des préparations témoins sans sérum; puis on recherche les amas de bacilles au microscope. Un sérum dont le titre agglutinatif est de 1/100 est celui dont une goutte additionnée de 50 gouttes d'eau distillée au maximum, constitue un mélange dont une anse peut agglutiner une anse d'émulsion charbonneuse après un 1/4 d'heure en chambre humide.

Pouvoir agglutinant du sérum normal.

Certains animaux fournissent un sérum qui n'agglutine pas du tout le charbon; tels sont la souris et le pigeon. D'autres agglutinent, mais il faut de fortes concentrations; c'est le cas pour les rats qui, adultes ou fœtus, n'agglutinent qu'à 1/10, le cheval à 1/30 et la chèvre à 1/40. Quelques-uns agglutinent encore le bacillus anthracis à des dilutions déjà considérables, par exemple, le cobaye donne des amas à 1/40 instantanément, le bœuf à 1/120, et le chien à 1/100 après 1/4 d'heure.

Enfin, — et cela fait l'objet d'un travail entrepris en même temps que le nôtre par MM. Lambotte et Maréchal, — le sang humain normal, chez beaucoup de sujets, jouit d'un pouvoir agglutinant tout à fait remarquable, presque spécifique, allant jusque 1/500 vis-à-vis du bacillus anthracis [2].

Pouvoir agglutinant du sérum d'animaux immunisés.

On sait que, en injectant à des animaux des cultures typhique

1. Beaucoup d'auteurs n'indiquent pas le temps d'observation : c'est un facteur essentiel pour la détermination du titre agglutinatif.
2. Voir *Annales Pasteur*, août 1899.

ou cholérique, on obtient un sérum doué d'un pouvoir agglutinant très considérable vis-à-vis du microbe correspondant. *En est-il de même dans le charbon? A priori*, il n'était pas possible de répondre d'une façon affirmative à cette question; il est, en effet, démontré que, dans certaines affections, les processus immunisants confèrent bien aux humeurs un pouvoir antitoxique ou préventif, mais nullement la propriété agglutinante [1]. Ce sont là des propriétés absolument dissociables.

Nous avons étudié l'agglutination expérimentale chez le chien, le cobaye et la chèvre. Les animaux ont reçu sous la peau des injections d'émulsion de charbon vaccin I non chauffées.

Voyons d'abord l'effet d'une seule injection.

Au chien I, de taille moyenne, dont le pouvoir agglutinant maximum du sang normal était de 1/100, nous injectons sous la peau du dos 1 c. c. d'émulsion de vaccin I.

Dès le lendemain, le pouvoir agglutinant du sang était de 1/320. Ce titre est resté tel, sans variations prononcées, pendant une quinzaine de jours, et il est revenu graduellement au taux du point de départ au 21e jour.

Au chien II (pouvoir agglutinant normal 1/70), nous injectons, tous les 2 jours régulièrement, des doses croissantes de vaccin I; parti de 1 c. c. d'émulsion, nous arrivons à lui injecter en une fois 6 c. c.. Ces injections ont été faites pendant 2 mois. Le sérum a fini par agglutiner à 1/900. Ce pouvoir agglutinant a pu être maintenu par de petites injections répétées de 3 en 3 jours.

Au chien III (pouvoir agglutinant normal 1/80), nous injectons pendant 1 mois, tous les deux jours régulièrement, des doses croissantes de vaccin I, de façon à arriver à lui injecter en dernier lieu, en une fois, tout le dépôt de 2 cultures sur gélose de 2 jours à 22°; après ce temps son pouvoir agglutinant atteint 1/1100.

Le pouvoir agglutinant peut donc être exalté chez les chiens immunisés. On remarque seulement que le titre, malgré de nombreuses injections, ne devient pas aussi élevé que pour le typhus et le choléra chez les animaux injectés avec les microbes correspondants.

Chez le cobaye, on arrive aussi à obtenir un sérum agglutinant, mais moins fort; 2 cobayes ont reçu tous les jours pendant

1. Metschnikoff. Immunität. *Handbuch der Hygiene* 1897.

3 mois, de petites injections de vaccin I (jamais plus de 1 1/2 c. c.) Le pouvoir agglutinant, qui était normalement de 1/40, est monté chez l'un à 1/120, chez l'autre à 1/300 (dans ces cas, il s'agit d'agglutination instantanée).

Il en est de même chez la chèvre; par des injections pratiquées tous les jours et à des doses ne dépassant jamais 2 c. c., nous avons porté le pouvoir agglutinant d'une chèvre de 1/40 à 1/400 après 2 mois.

On sait, d'après Fodor, que les injections de certaines substances renforcent l'immunité charbonneuse; c'est le cas pour le bicarbonate de soude. Nous avons voulu savoir si, en injectant en même temps que le vaccin I, mais à un autre point de la peau, de fortes doses (10 c. c.) de bicarbonate de soude à 10 0/0 dans l'eau, le pouvoir agglutinant ne serait pas augmenté. Il n'en a rien été; au contraire, l'ascension de ce pouvoir agglutinant s'est faite plus lentement que chez le témoin.

Nous nous sommes demandé aussi si le pouvoir agglutinant ne serait pas plus considérable après des injections, non plus de vaccin I, mais de charbon virulent. Nous avons injecté à deux petits chiens de même poids le dépôt d'une culture sur gélose de 1 jour à 37°, au premier de charbon virulent, au second de vaccin I. Le lendemain, le pouvoir agglutinant du 1er pour le vaccin I, qui auparavant était de 1/50, est toujours resté au même taux de 1/50: chez le second, au contraire, le pouvoir agglutinant, auparavant de 1/70, est passé le lendemain à 1/200, et. 3 jours après, il était de 1/800, sans que l'on ait renouvelé l'injection. Un prochain travail de M. Malvoz développera ces trois importantes constatations d'une agglutination spécifique pour la race microbienne injectée et non pour l'espèce.

PROPRIÉTÉS DES AGGLUTININES DU CHARBON

I. *La propriété agglutinante du sérum de ces animaux était-elle spécifique?*

Nous avons vérifié, à ce point de vue, les bacilles typhique, cholérique, le coli-bacille, le bac. pyocyaneus, le vibrio-Metchnikovi. Aucune de ces émulsions n'a été agglutinée par le sérum dilué au 1/20.

Il s'agit donc bien d'un sérum *spécifique*. Cette spécificité va

très loin, car nous avons vu que si l'on injecte à deux chiens, à l'un du 1er vaccin, à l'autre du charbon virulent, le sérum du premier agglutine le 1er vaccin, mais pas celui du second.

II. *Le pouvoir agglutinant du sérum vis-à-vis du charbon passe-t-il au fœtus?*

Nous nous sommes servi, pour étudier ce point, d'une chèvre dont le pouvoir agglutinant avait été porté, alors qu'elle était pleine, de 1/40 à 1/400, comme il a été dit plus haut. A ce moment, la chèvre mit bas 3 petits dont nous avons examiné le sang et la sérosité péricardique au point de vue agglutinant; nous n'y avons jamais trouvé un pouvoir agglutinant supérieur à 1/18, c'est-à-dire que les *agglutinines du charbon ne semblent pas passer au fœtus, chez l'animal immunisé.*

III. *Les agglutinines transsudent-elles du sang dans les liquides de l'organisme?*

Nous avons, à ce sujet, expérimenté le sang et des liquides transsudés, tant chez l'organisme sain que chez l'animal immunisé par des injections de charbon vaccin I.

Sujets normaux : Chez un homme dont le sérum sanguin agglutine à 1/80, le liquide d'une pleurésie séreuse aiguë n'agglutine qu'à 1/8. Chez un chien normal agglutinant à 1/40, le liquide d'œdème obtenu par la ligature d'une patte n'agglutine qu'à 1/16.

Sujets immunisés : Le même procédé (ligature) nous donne chez un chien agglutinant à 1/320, des phlyctènes à la patte ; le liquide des bulles agglutine à 1/200; chez un second chien agglutinant à 1/800, le liquide d'œdème malheureusement très rouge (contenant donc probablement une certaine quantité de sang pur) a un pouvoir agglutinant de 1/600. Enfin, chez un cobaye agglutinant à 1/300, un œdème inflammatoire étendu fournit un liquide qui n'agglutine qu'à 1/150.

En résumé, *les agglutinines peuvent passer à travers les parois vasculaires; seulement elles sont loin d'y passer en totalité.* Les écarts notables que nous constatons dans le pouvoir agglutinant des liquides expérimentés, tiennent certainement aux différences qui existent nécessairement dans les conditions expérimentales, qui sont très difficiles à remplir chaque fois de la même façon.

IV. *Les agglutinines du charbon peuvent-elles dialyser ?*

Si, comme Buchner l'a fait pour les substances bactéricides, nous mettons dans un dialyseur en parchemin 8 c. c. de sérum agglutinant à 1/800, et si nous plongons ce dialyseur dans 3 1/2 litres d'eau distillée et stérilisée, on constate, après avoir laissé l'appareil pendant 27 heures à 4°, que le pouvoir agglutinant du sérum est tombé de 1/800 à 1/120. En somme, *les agglutinines dialysent parfaitement quand le liquide inférieur est de l'eau distillée.*

Buchner a ingénieusement modifié cette expérience en remplaçant cette eau distillée par du sérum artificiel, cherchant ainsi à se rapprocher du sérum normal du chien. Nous avons fait de même pour les agglutinines, mais en nous rapprochant davantage encore de ce sérum normal de chien. Nous basant sur les chiffres donnés par Hoppe-Seyler sur la teneur en sels de ce sérum, nous avons ajouté à 3 1/2 l. d'eau distillée stérilisée les quantités nécessaires de Na^2SO^4, $NaCl$, Na^2HPO^3, et Na^2CO^3. Après 24 heures de dialyse à 4°, nous avons constaté que le pouvoir agglutinant du sérum était encore de 1/400, c'est-à-dire diminué seulement de moitié. En résumé, *les agglutinines du charbon qui dialysent bien quand le liquide inférieur est de l'eau distillée, passent aussi, en assez forte proportion, quand ce liquide se rapproche chimiquement du sérum normal du chien.*

Nous avons également recherché quelle était la façon de se comporter des agglutinines, quand on remplace le dialyseur en parchemin par un sac en collodion. Chez un cobaye, dont le sérum sanguin agglutine, après des injections multiples, à 1/120 instantanément, nous introduisons dans la cavité péritonéale un sac en collodion renfermant une émulsion de charbon vaccin I; 15 heures après, le sac est retiré et l'on ne constate au microscope absolument aucun amas microbien. Par conséquent, *les agglutinines ne passent pas à travers un sac de collodion mis dans la cavité péritonéale d'un animal immunisé*, ainsi qu'il fallait s'y attendre d'après les essais obtenus au moyen des transsudats.

V. *Quelle est l'action des hautes et des basses températures sur les agglutinines du charbon ?*

L'action de la chaleur a été examinée par divers auteurs déjà en ce qui concerne les agglutinines développées chez les typhoï-

diques et les cholériques. Comme eux, nous avons chauffé à 55° pendant 15 minutes 1 c. c. d'un sérum agglutinant à 1/160 ; après refroidissement, le pouvoir agglutinant était conservé intact. Il en a été de même pour un sérum agglutinant à 1/800 et qui, pour être stérilisé, a été soumis 3 jours de suite pendant 2 heures à une température de 56°.

Les agglutinines du charbon se comportent donc comme les agglutinines classiques vis-à-vis de la chaleur.

D'un autre côté, nous avons soumis, à deux reprises, 1 c. c. d'un sérum agglutinant à 1/250 à la congélation pendant plusieurs minutes ; examiné ensuite, le pouvoir agglutinant était demeuré le même.

VI. *Le sérum agglutinant spécifique est-il bactéricide ?*

Cette question soulève un point doctrinal très important. Comme vient de le faire remarquer Bordet [1], dans beaucoup de travaux sur les substances bactéricides des humeurs, on a négligé de tenir compte du phénomène de l'agglutination. Pour déterminer si un sérum est bactéricide, on a procédé généralement de la façon suivante : à une quantité donnée de sérum, on ajoute une anse d'émulsion de microbes, et de temps en temps, on prélève une anse de ce mélange, que l'on ensemence en gélatine, coulée ensuite en plaque Pétri. On compte chaque fois les colonies. Or, il peut très bien se faire que l'on obtienne moins de colonies après une heure qu'après dix minutes, par exemple, sans que l'on puisse conclure qu'un certain nombre de microbes aient été tués par le sérum ; il a suffi que celui-ci ait agglutiné ces microbes ; ces amas, en gélatine, ne donneront qu'une colonie.

Pour éviter cette cause d'erreur, nous nous y sommes pris de la façon suivante : à 1 c. c. de sérum normal de chien agglutinant seulement à 1/30, nous ajoutons 5 gouttes d'émulsion de charbon vaccin I : ce centimètre cube de sérum eût suffi à agglutiner 30 c. c. de la même émulsion. En même temps, nous délayons dans un centimètre cube d'eau distillée, 5 gouttes de la même émulsion. De chacune de ces deux préparations, nous prenons une anse que nous ensemençons en gélatine, et nous faisons

1. Bordet, Le mécanisme de l'agglutination, ces *Annales*, Mars 1899.

une préparation microscopique colorée au bleu de méthylène phéniqué, et cela immédiatement après l'ensemencement, puis 1/2 heure après, et encore 5 heures après. Tandis que les plaques obtenues avec la culture en eau distillée nous donnent toujours des colonies innombrables, celles que nous obtenons de la culture en sérum nous donnent successivement 2,163, 2,888, puis 5013 colonies, immédiatement après, puis 1/2 heure, puis 5 heures après l'ensemencement en sérum. En même temps, les préparations microscopiques nous montrent des amas toujours bien colorés et de plus en plus considérables.

En d'autres termes, la différence entre le nombre de colonies de la plaque témoin et celui de la première plaque obtenue de la culture en sérum ne peut être due qu'aux agglutinines du sérum normal, car il est évident que le pouvoir bactéricide du sérum, s'il avait existé, n'aurait pas eu le temps d'agir immédiatement au moment de l'ensemencement. La multiplication des colonies dans la 3e plaque prouve l'*absence de substances bactéricides dans le sérum normal du chien.*

VII. *L'agglutination notablement augmentée par les injections de vaccin charbonneux chez le chien s'accompagne-t-elle d'un pouvoir bactéricide anormal?*

Nous avons opéré de la même façon que pour le chien normal, en ensemençant des tubes témoins et des tubes avec sérum spécifique; seulement, pour rendre plus évident encore le rôle de l'agglutination dans les résultats de l'expérience, nous avons ensemencé, dans d'autres tubes de sérum, un microbe que le sang du chien n'agglutine pas, le staphylocoque pyogène. Tandis que les tubes témoins et les cultures de staphylocoque, chauffées ou non, nous ont toujours donné, en plaques Pétri, des colonies innombrables, les cultures en sérum de 1er vaccin, *chauffées ou non*, ne nous ont donné, immédiatement après l'ensemencement en sérum, que 25 et 30 colonies; les plaques faites 3 heures après donnaient 120 et 71 colonies, et 22 heures après, les colonies étaient devenues innombrables, ce qui s'est continué les jours suivants. Par conséquent, c'est encore à l'agglutination — ce qu'ont, du reste, montré les préparations microscopiques colorées — qu'il faut attribuer la chute du nombre de colonies dans les premières plaques. Les dernières ont démontré, comme

pour le sérum normal, que le sérum du chien immunisé ne contient pas de substances germicides. Ce qui le prouve du reste à l'évidence, c'est que le sérum chauffé n'a pas donné plus de colonies que le sérum non chauffé : or il est démontré que la chaleur détruit les substances bactéricides du sérum. *Le sérum agglutinant spécifique n'est donc pas plus bactéricide que le sang normal.*

Ce qui prouve du reste, d'une façon encore plus certaine, que l'agglutination des microbes n'entraîne pas leur mort, c'est-à-dire que les agglutinines et les lysines sont des substances absolument différentes, c'est le fait qu'il est parfaitement possible de suivre la multiplication des microbes agglutinés sous le microscope. Pour cela, on ajoute à 36 gouttes, par exemple, de gélatine stérilisée et renfermée en tube stérile, 2 gouttes du sérum spécifique et 2 gouttes d'émulsion microbienne. On place le tout à 37° pendant une 1/2 heure environ; après quoi on dépose, de cette culture, une ou deux anses en goutte pendante sous le microscope; dès qu'on a trouvé un amas microbien bien isolé, on fixe ce point de la préparation : le tout est porté à 22° et tenu en observation.

Nous nous sommes convaincu de la sorte qu'un sérum de chien, agglutinant le charbon vaccin I à 1/200, et employé à la dose de 1/20, n'empêchait nullement la prolifération des microbes agglutinés; même le sérum au titre de 1/900 n'exerce pas d'action empêchante à la forte dose de 1 p. 20. Il y a plus : un sérum de typhoïdique agglutinant à 1/500, un typhus-sérum (de M. van de Velde), agglutinant à 1/100000, employés au 1/10, ont permis au *bacillus typhosus* de se multiplier dans les conditions précitées. Par conséquent, pas la moindre action bactéricide; *agglutinines et lysines sont des substances différentes.*

Du reste, la même conclusion se dégage de nos expériences de dialyse. Si, ainsi que Buchner l'a démontré, les substances bactéricides dialysent bien dans l'eau pure, de même que les agglutinines, celles-ci passent dans le sérum normal, alors que les lysines restent dans le dialyseur.

D'autre part, ainsi que MM. Malvoz et Lambotte l'ont constaté, les lysines de la fièvre typhoïde traversent parfaitement les sacs de collodion chez les cobayes immunisés; nous avons vu que cette propreté n'appartient pas aux agglutinines.

Le bicarbonate de soude qui renforce l'état bactéricide n'augmente pas le pouvoir agglutinant.

Enfin, si agglutinines et substances bactéricides se comportent de la même façon vis-à-vis de la congélation, les premières sont réfractaires, les secondes sensibles aux températures de 55 à 60°.

VII. *Existe-t-il une relation quelconque entre la propriété agglutinante et la leucocytose ?*

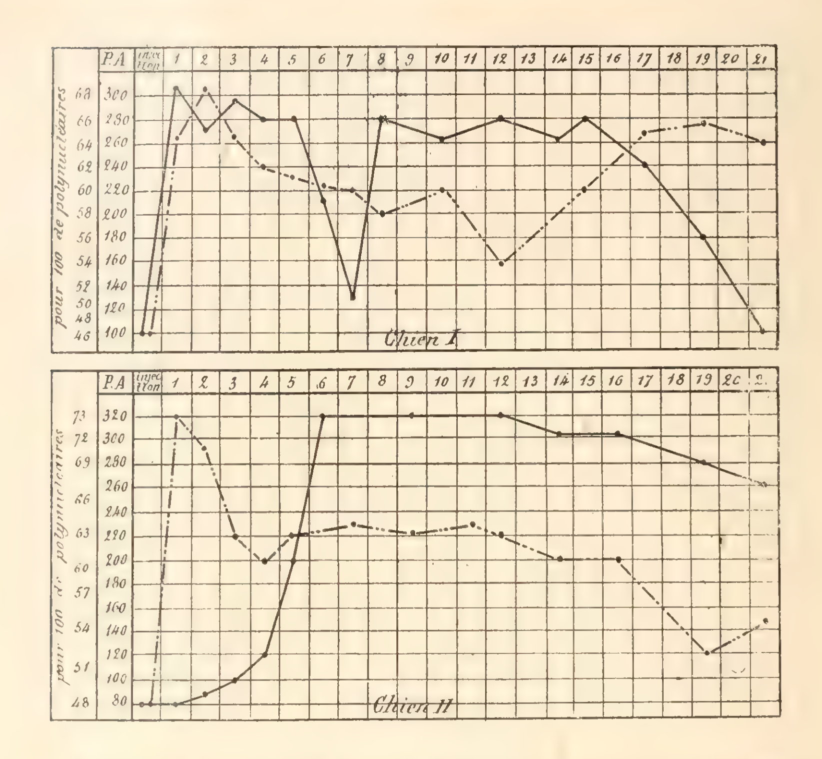
On admet généralement que les propriétés bactéricide et préventive sont, pour beaucoup de maladies, intimement liées à la proportion des leucocytes, et particulièrement des leucocytes polynucléaires, qui circulent dans les humeurs. Si, ainsi que Gruber [1] et Courmont [2] en ont émis l'hypothèse, le pouvoir agglutinant marche de pair avec la propriété protectrice d'un sérum (Gruber) ou avec son pouvoir atténuant (Courmont), il semble qu'il doive exister quelque rapport entre la leucocytose (polynucléaire) et l'agglutination.

Nous avons suivi simultanément les variations du pouvoir agglutinant et de la proportion de polynucléaires dans le sang chez 2 chiens, dont l'un avait reçu une injection de 1 c. c. d'émulsion charbonneuse, et le second, en outre, une injection de 20 c. c. de bicarbonate de soude à 10 0/0. Pour rechercher la proportion de leucocytes polynucléaires, nous avons compté, dans trente champs microscopiques pris au hasard dans trois préparations, tous les leucocytes d'une part et les polynucléaires de l'autre, ce qui donne une approximation assez exacte. Voici, sous forme de figures, nos résultats :

Ces tracés nous montrent, surtout celui du chien II, la discordance la plus complète entre l'ascension des polynucléaires qui se fait ici beaucoup avant celle du pouvoir agglutinant, alors que pour le chien I le summum du pouvoir agglutinant (P. A.) est atteint avant celui des polynucléaires. Cette discordance se continue dans le milieu de la courbe pour chacun des tableaux, et pour la fin il suffit de jeter un coup d'œil sur le tableau du

1. Gruber, *Münchener medicin. Wochenschrift*, n° 9, 1896.
2. Courmont, *Thèse de Lyon*. Sur le séro-pronostic de la fièvre typhoïde.

chien I pour constater toute *absence de rapport entre la proportion de polynucléaires dans le sang et la propriété agglutinative.*



S'il en est ainsi, nous devons retrouver dans un sang *complet*, mais privé de ses leucocytes polynucléaires, la totalité du pouvoir agglutinant. Nous sommes, en effet, arrivé à ce résultat en faisant pour les agglutinines ce que MM. Denys et Havet ont fait pour les substances germicides du sang du chien, c'est-à-dire en filtrant du sang rendu incoagulable. Après avoir constaté que l'oxalate de potassium est sans influence sur le pouvoir agglutinant, nous avons filtré un sang agglutinant à 1/800 et additionné d'un peu d'oxalate; le liquide filtré, privé de leucocytes, agglutine aussi bien que le sérum obtenu par coagulation.

Mais certains savants (Bail[1], par exemple) ont soutenu que les leucocytes polynucléaires n'émettaient les substances bacté-

1. Pour la bibliographie des travaux sur les substances bactéricides et les leucocytes, voir la belle revue de Besredka. *Annales Pasteur*, 1898, p. 607.

ricides qu'après leur mort. *Les leucocytes morts dégagent-ils des agglutinines?* Si oui, il faudra bien admettre qu'il y a, sinon identité, du moins grande parenté d'origine entre les agglutinines et ces substances germicides.

Par divers moyens, plusieurs auteurs sont arrivés à fabriquer des extraits leucocytaires jouissant de propriétés microbicides très marquées. Ce sont leurs procédés que nous avons appliqués, et cela aussi bien sur des leucocytes provenant d'animaux normaux que d'animaux injectés par le vaccin I.

Un abcès s'étant développé chez un enfant dont le sérum sanguin agglutinait à 1/80, nous avons traité le pus qu'il contenait par les procédés employés par Lowit, Schattenfroh (2 procédés) et Büchner. Ce sérum du pus agglutinant à 1/30, chacun de ces extraits ne nous a donné qu'une agglutination de 1/24.

De même chez un chien agglutinant à 1/600, l'extrait Büchner du pus d'un abcès sous-cutané n'agglutine qu'à 1/80; chez un cobaye qui agglutine à 1/100, cet extrait d'un abcès donne un liquide agglutinant à 1/10; chez un chien agglutinant à 1/900, l'extrait Lowit ne donne qu'un pouvoir agglutinant à 1/220.

D'autre part, ayant obtenu au moyen d'une injection intrapleurale de gluten-caséine un empyème chez un chien agglutinant à 1/320, l'extrait Büchner agglutinait seulement à 1/80; enfin, un chien agglutinant à 1/900 nous ayant fourni par le même procédé un pus pleural assez abondant, nous avons pu appliquer tous les procédés employés pour l'obtention des extraits leucocytaires; toujours nous avons obtenu une agglutination variant entre 1/60 et 1/200.

En résumé, *tant à l'état normal que chez les animaux dont on a exalté le pouvoir agglutinant par des injections multiples de charbon vaccin I, on peut affirmer que les leucocytes vivants ne sont nullement les producteurs ou les détenteurs des agglutinines, et par conséquent que, à l'inverse des substances bactéricides, leur mort n'amène pas le passage de ces substances dans le sérum, où elles existent du reste primitivement.*

*
* *

Si les globules blancs ne semblent pas intervenir dans la production des agglutinines, *d'autres organes ne jouent-ils pas un rôle plus direct dans leur élaboration?*

Cette question, étudiée par plusieurs auteurs déjà, a reçu les réponses les plus diverses et les plus contradictoires. Nous l'avons également examinée en ce qui concerne les agglutinines du charbon chez l'animal normal d'abord, chez l'animal immunisé ensuite. Toujours le sujet a été tué par la saignée carotidienne, de façon à rendre ses organes le plus possible exsangues et à écarter les causes d'erreur qui auraient pu résulter de la présence du sang. Tous les organes ont été examinés de la même façon, consistant, comme pour l'extrait Lowit, à les broyer avec une quantité déterminée d'eau et de sable, et à vérifier le pouvoir agglutinant du liquide surnageant.

Chez un cobaye normal, agglutinant à 1/40, seules les glandes sous-maxillaires nous ont donné un pouvoir agglutinant très peu marqué : 1/14. Chez un cobaye injecté, agglutinant à 1/120, le pancréas nous a fourni un extrait agglutinant à 1/28, les ganglions lymphatiques du cou [1], le foie, la rate et les testicules à 1/14. Enfin, chez un cobaye agglutinant à 1/300, la rate nous a donné un pouvoir agglutinatif de 1/70, les reins à 1/42, la moelle osseuse des fémurs, les glandes sous-maxillaires et les testicules à 1/28, le pancréas et les poumons à 1/14. Les organes que nous ne citons pas ont été examinés, mais leur teneur en agglutinines était tellement faible que nous n'avons jamais constaté d'agglutination chez eux. Or, en dehors de la variété des organes qui, ainsi qu'on peut le voir, nous fournissent, tantôt l'un tantôt l'autre, un certain pouvoir agglutinant, il faut encore que nous fassions remarquer que toujours les organes les plus riches en sang (malgré la saignée) avaient le pouvoir agglutinant le plus fort.

Cela revient à dire que chacun des organes que nous avons examinés n'a jamais possédé qu'un pouvoir agglutinant très inférieur à celui du sérum, pouvoir agglutinant qu'ils devaient sans aucun doute au sang qu'ils contenaient encore. Cela nous permet d'affirmer, contrairement à l'opinion de certains auteurs qui, comme van Emden [2], ont reconnu un pouvoir producteur d'agglutinines à tous les organes ou à peu près, *qu'il est*

1. Manfredi et Viola (*Zeitschrift für Hygiène*, Vol. XXX, 1) font jouer un grand rôle aux ganglions lymphatiques, particulièrement du cou, dans l'immunité contre le charbon.

2. VAN EMDEN, *Zeitschr. für Hygiene*. Bd XXX, 1er Heft, p. 19.

très difficile d'attribuer aux organes ou aux cellules de l'organisme une intervention quelconque dans la fabrication des agglutinines. L'expérience suivante montre du reste combien *le rôle de l'organisme semble véritablement passif*, tout différent de ce qu'il est notamment dans la production des antitoxines.

Si l'on saigne un animal dont le sang contient des antitoxines, celles-ci se reproduisent rapidement, ainsi qu'il résulte des recherches classiques de Roux et Vaillard, confirmées par Salomonsen et Madsen [1]. Saignons un chien que nous avons rendu agglutinant, par des injections successives, à 1/800 : 3 jours après la saignée, son pouvoir agglutinant est de 1/350 et, après 17 jours, il est revenu au taux normal de 1/100 qu'il possédait avant toute injection.

Or, une saignée, dans le cas où tous les organes — ou l'un ou l'autre d'entre eux — interviendraient dans la production d'agglutinines, ne peut évidemment avoir une grande influence sur cette production, et nous devrions voir remonter le taux du pouvoir agglutinant du sang, comme on l'observe quand il s'agit d'antitoxines. Au contraire, si l'organisme est passif, les agglutinines ne se reformeront pas (naturellement dans la supposition qu'on n'injecte plus rien à l'animal) et s'élimineront petit à petit. En enlevant au chien, par la saignée, les 2/5 de son sang, nous avons abaissé sa teneur en agglutinines d'une quantité telle que son sérum n'agglutine plus qu'à 1/350, tout comme un chien qui n'a reçu qu'une seule injection (voir page 644). Comme lui il va éliminer ses agglutinines et cela dans le même laps de temps. C'est en effet ce que nous constatons dans nos expériences.

* * *

Nous avons tenu à donner avec quelques détails les expériences variées que nous avons faites sur l'agglutination dans le charbon, non seulement parce que ce phénomène n'avait guère été étudié dans cette maladie, mais encore parce que ces recherches semblent montrer que, en ce qui concerne tout au moins l'infection charbonneuse, l'agglutination n'est pas un phénomène jouant dans l'immunité et la défense de l'organisme le rôle qu'il y a peu de temps encore, certains auteurs, tels que Grüber, etc., ont voulu lui faire jouer.

1. SALOMONSEN et MADSEN, *Annales Pasteur*, 1898, p. 763.

Au point de vue de l'immunité *naturelle*, par exemple, il n'y a pas la moindre relation à établir entre l'état réfractaire d'un animal au charbon et le pouvoir agglutinant de son sérum; le rat, si réfractaire, a un sérum très peu agglutinant; le chien, réfractaire, agglutine assez fort; l'homme, sensible au charbon, a un sérum qui agglutine parfois presque aussi fort que celui des animaux immunisés; le bœuf, également très sensible, a un sang normal fortement agglutinant, et ainsi de suite.

Il serait également bien difficile de trouver un rapport quelconque entre le pouvoir bactéricide d'un sérum et la faculté agglutinative, envisagée au point de vue de l'immunité. Le rat, dont le sérum — c'est un fait classique — est normalement très bactéricide, n'agglutine pas; pour le chien, c'est le contraire; de plus, le chien ayant reçu de fortes quantités de charbon vaccin I, et dont le sérum est devenu très agglutinant, n'est pas plus bactéricide que normalement.

Considérées au point de vue de leur origine, les propriétés bactéricide et préventive d'une part, et la faculté agglutinative dans le charbon, de l'autre, sont absolument différentes. Alors qu'il est généralement admis que les substances bactéricides et les *anticorps* sont élaborés par les cellules de l'organisme, soit dans le sang, soit dans certains organes (rate, moelle osseuse, etc.), les agglutinines du charbon ne paraissent nullement provenir de ces cellules; ces organes semblent, au contraire, jouer un rôle très passif dans la production des agglutinines.

Quant à leurs caractères comparés, on a vu que les agglutinines se comportaient de la même manière que les substances microbicides vis-à-vis de la congélation, et à peu près de la même façon dans la dialyse à travers un tube en parchemin; au contraire, elles s'en séparent complètement vis-à-vis de l'action des températures élevées, dans la dialyse à travers un sac de collodion, dans l'influence qu'exerce sur leur production une injection de bicarbonate de soude. Les agglutinines ne se régénèrent pas comme les antitoxines, quand on les a mécaniquement enlevées à l'organisme, par la saignée.

1. London (*Archives des sciences biolog. de l'Institut impérial de Saint-Pétersbourg*. Tome VI, n° 2) a en effet démontré que la saignée n'influençait nullement le pouvoir bactéricide du sang.

Institut d'anatomie pathologique et de bactériologie de l'Université de Liège, 25 avril 1899.

SUR LE DOSAGE DE L'ACIDE SUCCINIQUE

DANS LES LIQUIDES FERMENTÉS

PAR J. LABORDE ET L. MOREAU

I

L'acide succinique est un des produits principaux de la fermentation alcoolique, qui en engendre toujours de petites quantités, ainsi que l'a montré Pasteur. Dans l'analyse des liquides fermentés de ses expériences, Pasteur [1], pour doser l'acide succinique, épuisait l'extrait sec de ces liquides par un mélange d'alcool et d'éther qui enlevait la glycérine et l'acide succinique; il séparait ensuite les deux corps dissous dans l'eau, après évaporation du premier dissolvant, en saturant l'acide par l'eau de chaux et reprenant l'extrait sec de la dissolution par le mélange éthéro-alcoolique, qui enlevait la glycérine et laissait le succinate de chaux; celui-ci, purifié par l'alcool à 80°, était pesé après dessiccation.

Cette méthode s'appliquait à des liquides de composition relativement très simple, puisqu'ils provenaient de fermentations mises en train avec de l'eau sucrée et de la levure en quantité suffisante; si elle donne de bons résultats dans ces circonstances, il n'en est pas de même quand on veut s'en servir avec des liquides fermentés de composition très complexe comme le vin, comme on l'a reconnu depuis longtemps.

La méthode Macagno [2] et d'autres encore ont été établies dans le but de remédier aux inconvénients de la méthode Pasteur, mais la plupart sont beaucoup trop compliquées pour un usage courant, et cette complication est loin de garantir l'exactitude des résultats.

Celle qui est la plus ordinairement employée actuellement est

1. Mémoire sur la fermentation alcoolique — *Ann. de ch. et de Phys.* 3e s., t. LVIII, 1860.
2. Lavori es. nella R. Staz. di Asti, 1880.

la méthode de M. Ch. Girard[1] qui peut s'appliquer au vin et à des liquides analogues. On évapore le liquide dans le vide en présence de sable pour diviser le résidu et faciliter son épuisement par l'éther anhydre; le poids de l'acide succinique, obtenu après évaporation de l'éther, est déterminé par un titrage acidimétrique. L'acide succinique, qui a été extrait de cette manière, peut être considéré comme suffisamment exempt d'autres acides, si le liquide qui le contenait provenait d'une fermentation alcoolique pure, mais il est toujours mélangé à de la glycérine qui se dissout aussi partiellement dans l'éther.

La méthode donne donc d'assez bons résultats, mais elle a un inconvénient, c'est d'exiger, comme celle de Pasteur, des évaporations lentes et peu pratiques dans le cas d'essais nombreux à faire simultanément.

On ne peut procéder autrement parce que, d'après Pasteur, on perd des quantités sensibles d'acide succinique quand on termine l'évaporation à l'air libre, à une température supérieure à la température ordinaire. Pasteur n'a pas indiqué la raison de ces pertes, et personne après lui ne paraît s'en être occupé. Il nous a paru intéressant de connaître cette raison : les recherches que nous avons faites dans ce sens nous l'ont fournie et nous ont conduits à une méthode de dosage de l'acide succinique plus expéditive et au moins aussi précise que celles que l'on connaît actuellement.

II

Si on procède au dosage de l'acide succinique dans un vin, en évaporant à l'air libre, au bain-marie bouillant, ou à l'étuve à une température même bien inférieure à 100°, on trouve des chiffres qui, comparés à ceux fournis par la méthode Ch. Girard, sont inférieures de 3 à 4 décigrammes par litre. On retrouve des différences analogues en évaporant le vin, non plus à l'air libre, mais dans le vide à une température supérieure à la température ordinaire, pour aller plus vite, à 50° par exemple. Dans ce dernier cas, on peut recueillir les produits de l'évaporation, et l'on constate qu'ils contiennent des acides volatils, mais non de l'acide succinique. Par conséquent, les pertes indiquées ne sont dues ni à une volatilisation ni à un entraînement de l'acide succinique, et elles ne peuvent résulter que d'une réaction se passant au sein

1. Rapport sur les travaux du Laboratoire municipal, Paris, 1885.

du liquide concentré et chaud. Nous avons reconnu, en effet, qu'elles sont la conséquence d'une éthérification de l'acide succinique en présence de la glycérine qui existe dans tous les liquides fermentés : c'est ce qui résulte des expériences suivantes.

On a évaporé à sec au bain-marie bouillant : 1° une solution aqueuse d'acide succinique contenant 0 gr. 1 de ce corps ; 2° la même solution, à laquelle on avait ajouté 0 gr. 4 de glycérine ; 3° on a prolongé de 2 heures le séjour au bain-marie d'un autre essai pareil au précédent, après sa dessiccation complète ; 4° on a ajouté à la solution d'acide succinique et de glycérine quelques gouttes d'acide chlorhydrique, et l'on a évaporé à sec. La détermination de l'acide succinique libre dans les différents essais a donné les résultats suivants :

Nos des essais.	Acide succinique retrouvé.
1	0gr,0999
2	0gr,0928
3	0gr,0814
4	0gr,0265

Ces résultats, obtenus par des titrages acidimétriques faits dans les conditions habituelles, c'est-à-dire en employant des liqueurs froides et diluées, montrent que la perte d'acide succinique a été nulle dans le premier cas, tandis qu'elle a augmenté de plus en plus dans les autres où il y avait de la glycérine, et où les conditions étaient de plus en plus favorables à la formation d'éthers glycériques.

Ce qui prouve encore que c'est bien ce phénomène d'éthérification qui a pour conséquence de masquer au titrage une partie de l'acide succinique, c'est que l'on peut retrouver la quantité initiale de cet acide introduit dans l'essai en opérant le titrage de façon à saponifier les éthers produits, comme nous l'indiquerons plus loin, et comme nous l'avons fait dans les trois derniers essais ; les pertes n'ont pas été supérieures à 0 gr. 001, et, par suite, ces éthers ne sont pas sensiblement volatils aux environs de 100°. Comme ils sont parfaitement solubles dans l'éther ordinaire, ils sont donc entraînés avec l'acide succinique pendant l'épuisement de l'extrait des liquides fermentés fait à chaud, et l'on conçoit facilement que l'on puisse, même dans ces conditions, arriver à déterminer la quantité totale d'acide succinique que contiennent ces liquides.

Le procédé que nous allons indiquer permet, en effet, de le

doser avec une assez grande précision; il s'applique seulement aux liquides complètement fermentés ou à peu de chose près, c'est-à-dire ne contenant pas une quantité de sucre supérieure à 1 0/0.

On prend 50 ou 100 c. c. de liquide, suivant sa richesse présumée d'après l'alcool qu'il contient, et on les évapore à sec, au bain-marie bouillant, dans une capsule de porcelaine à fond plat, en présence de 20 grammes de sable blanc, un peu grossier, lavé à l'acide chlorhydrique et calciné, en ayant soin de bien mélanger le sable et l'extrait pendant que celui-ci est encore sirupeux. Par refroidissement, la masse durcit et serait difficile à épuiser, si on ne la laissait pas se ramollir à l'air avant de continuer l'opération.

L'humidité de l'air qu'elle a absorbée au bout de quelques heures permet de la détacher ensuite facilement de la capsule; on l'introduit dans un matras de 250 c. c. environ, en rinçant la capsule avec un peu de sable neuf et d'éther; puis on ajoute dans le matras 100 grammes de grains de plomb n° 4 et 30 c. c. d'éther.

Par l'agitation du plomb, on arrive à un épuisement complet de la masse après trois nouvelles additions d'éther, en décantant chaque fois sur un filtre plat.

On chasse l'éther par distillation, on dissout le résidu avec un peu d'eau bouillante, et on ajoute une liqueur décime de potasse en présence de phénolphtaléine. Lorsque le virage est atteint, on ajoute un excès de potasse correspondant à la moitié environ du volume déjà employé, de façon à faire un nombre entier de c. c., et on procède à la saponification des éthers glycériques. Pour cela, il suffit d'évaporer à sec au bain-marie le liquide contenu dans un vase de Bohême cylindrique, de reprendre ce résidu par l'eau, et de titrer la potasse libre qu'il contient, en ajoutant un excès d'acide sulfurique décime, faisant bouillir un instant pour chasser l'acide carbonique, et déterminant l'excès d'acide par la liqueur décime de potasse. Il est alors facile de calculer le volume de cette dernière liqueur qui correspond à l'acide succinique total contenu dans l'essai.

Le chiffre ainsi obtenu est un peu trop fort; l'erreur est de 1 à 2 décigr. par litre pour les vins ordinaires sains, et correspond à un peu d'acidité volatile qui n'est pas complètement

chassée pendant l'évaporation du vin ; elle se retrouve d'ailleurs, et même plus élevée, dans le procédé Ch. Girard. Pour l'éliminer avec exactitude, il suffit de reprendre le liquide saturé par la potasse, de remettre en liberté l'acidité volatile par l'acide tartrique et de la doser par distillation. Cette méthode donne des résultats très constants pour un même liquide, et tout à fait voisins de ceux que l'on obtient par la méthode d'évaporation dans le vide à laquelle on applique la correction indiquée ; c'est ce que montrent les exemples suivants :

NATURE DU LIQUIDE FERMENTÉ		MODE D'ÉVAPORATION	
		Dans le vide.	Au bain-marie.
		gr	gr.
Vin blanc..........	1er essai	1,22	1,32
	2e —	1,30	1,34
Vin rouge	1er essai	1,48	1,51
	2e —	1,56	1,56
	3e —		1,61

On voit que les différences ne dépassent guère 0 gr. 1 par litre. C'est encore avec ce degré de précision que l'on retrouve l'acide succinique ajouté dans un vin en différentes proportions, ainsi que l'indiquent les chiffres suivants :

NATURE DU LIQUIDE	ACIDE SUCCINIQUE		
	Ajouté par litre.	Total par litre.	Trouvé par litre.
	gr	gr.	gr.
Vin primitif			1,68
— additionné de.....	0,25	1,93	1,95
— —	0,50	2,18	2,09
— —	1,00	2,68	2,63

On a encore vérifié l'exactitude de la méthode par des essais faits sur des liquides synthétiques, constitués par de l'eau de levure alcoolisée contenant de la glycérine, de la crème de

tartre, de l'acide tartrique libre, et des quantités connues d'acide succinique, qui ont été parfaitement retrouvées.

Dans ces expériences sur l'eau de levure, nous avons reconnu que ce liquide, préparé comme on le fait habituellement, ne contient qu'une très petite quantité d'acide succinique libre, tandis qu'il renferme une proportion beaucoup plus importante de cet acide sous forme de sels ; de sorte que, pour doser l'acide succinique total de l'eau de levure, il faut déplacer celui qui est combiné par une addition d'acide tartrique ou bien de bisulfate de potasse.

Mais dans le cas où l'acide succinique se trouve en présence d'acide tartrique libre, il arrive souvent qu'une petite quantité de ce dernier acide est dissoute par l'éther en même temps que le premier, et les résultats seraient par suite trop élevés si on ne les corrigeait pas. Il est facile de le faire très exactement, car on peut déterminer avec précision la quantité d'acide tartrique entraîné en le transformant en crème de tartre par une évaporation de la liqueur provenant du titrage des acides et une addition d'acide acétique et d'alcool. On purifie la crème de tartre par des lavages à l'alcool à 80°, on la dissout dans l'eau chaude, et on titre son acidité par la liqueur décime de potasse ; le double du volume employé correspond à la totalité de l'acide tartrique qu'elle contient, et constitue la correction à apporter au résultat primitif. En étudiant deux eaux de levure différentes à 10 0/0 : la première, de levure pressée de Springer ; la deuxième, de levure de brasserie essorée, nous avons trouvé les chiffres suivants rapportés à 1 litre d'eau de levure.

NATURE DU LIQUIDE	MODES D'ÉVAPORATION			
	DANS LE VIDE		AU BAIN-MARIE	
	N° 1.	N° 2.	N° 1.	N° 2.
	gr.	gr.	gr.	gr.
Eaux de levure primitives	0,05	0,08	0,05	0,09
Mêmes eaux de levure additionnées de 2 gr. par litre d'acide tartrique	0,46	0,50	0,49	0,43
Mêmes eaux de levure additionnées de 4 gr. par litre de bisulfate de potasse	0,58	»	0,55	0,46

L'acide succinique extrait de ces eaux de levure était parfaitement cristallisé, et ne laissait aucun doute sur sa pureté. On voit que les différentes marches suivies pour obtenir les poids d'acide succinique total ont une valeur à peu près égale, et que ces poids sont peu éloignés les uns des autres pour les deux eaux de levure considérées : ils établissent par conséquent que la levure essorée, formant une pâte assez consistante, contient environ 0,5 0/0 de son poids d'acide succinique, dont des traces seulement sont à l'état libre. C'est cette petite quantité d'acide ibre qui donne à l'eau de levure sa très faible réaction acide.

Cette étude de l'eau de levure nous a paru intéressante parce que ce liquide est souvent employé pour constituer des liquides fermentescibles acidulés ou non par l'acide tartrique.

III

Nous avons ensuite considéré le cas des liquides incomplètement fermentés, contenant des quantités de sucre supérieures à 1 0/0, pour lesquels la méthode précédente ne peut être appliquée directement ; le sucre, en trop forte proportion, gêne, en effet, l'extraction complète de l'acide succinique par l'éther. On peut tourner assez facilement la difficulté de la manière suivante :

On évapore le liquide à consistance sirupeuse ; on y ajoute 10 à 20 c. c. d'alcool suivant la quantité de sucre contenue dans l'essai, et du plomb comme précédemment. Puis on introduit dans le matras 50 c. c. d'éther, par petites fractions au début, en agitant vivement le plomb pour favoriser le contact de l'éther avec le liquide sirupeux qui se précipite sous forme d'émulsion blanche. Après repos de quelques instants, on décante l'éther sur un filtre, on ajoute de nouveau un peu d'alcool pour redissoudre le sirop, et on recommence sa précipitation par l'éther. Avec 3 à 4 lavages de ce genre, on a enlevé tout l'acide succinique et d'autres éléments du liquide fermenté. Le liquide d'extraction est alors distillé pour éliminer l'éther, puis le résidu alcoolique, introduit dans une capsule à fond plat avec du sable, est traité comme s'il s'agissait d'un liquide non sucré, c'est-à-dire qu'on l'évapore à sec au bain-marie, et qu'on l'épuise par l'éther seul en présence de plomb.

En procédant ainsi avec des liquides sucrés à 100 gr. par

litre contenant des quantités connues d'acide succinique, nous avons trouvé les résultats du tableau ci-dessous.

ACIDE SUCCINIQUE		ACIDE SUCCINIQUE	
Employé.	Calculé par litre.	Retrouvé.	Calculé par litre.
gr.	gr.	gr.	gr.
0,0125	0,250	0,0126	0,252
0,0250	0,500	0,0242	0,484
0,0500	1,000	0,0471	0,942
0,1000	2,000	0,0966	1,932

Nous avons aussi opéré sur des vins de richesse connue en acide succinique, auxquels nous avions ajouté, par 50 c. c. de vin primitif, jusqu'à 5 grammes de sucre, soit 100 grammes par litre, et nous avons obtenu les chiffres suivants rapportés à 1 litre de vin.

	Vins primitifs.	Vins sucrés.
Vin rouge...........	1gr,74	1gr,80
Vin blanc	1gr,37	1gr,41
Vin blanc	1gr,48	1gr,44

Les résultats sont, par suite, très satisfaisants, et la présence du sucre dans les liquides fermentés ne peut empêcher de connaître exactement la quantité d'acide succinique qu'ils contiennent.

A l'aide des deux méthodes que nous venons d'indiquer, on pourra donc procéder avec une exactitude suffisante au dosage de l'acide succinique dans les liquides complètement ou incomplètement fermentés, mais provenant toujours d'une fermentation alcoolique pure. Elles sont applicables, par exemple, à tous les vins normaux plus ou moins sucrés ; mais pour ceux qui ont subi l'action des ferments d'altération, lesquels, comme on sait, peuvent donner naissance à de l'acide lactique, soluble dans l'éther comme l'acide succinique, il est nécessaire, après l'extraction des deux acides, de procéder à leur séparation par les méthodes connues.

LA SACCHARIFICATION DE L'AMIDON

Par M. POTTEVIN.

De la discussion à laquelle M. Duclaux a soumis, dans ces Annales et dans le tome II de son *Traité de Microbiologie*, les théories proposées au sujet de la saccharification de l'amidon, on peut conclure, je crois, que les savants ne sont pas d'accord sur ce point, et que la principale difficulté vient de ce qu'on ne sait pas bien ce que sont la dextrine ou les dextrines. Les seules notions qui semblent bien établies à leur sujet sont les suivantes :

Les dextrines ont même composition centésimale que l'amidon ; elles possèdent un pouvoir rotatoire droit égal pour toutes et égal à celui de l'amidon ; elles sont dénuées de pouvoir réducteur ; pour toutes celles qu'on a pu soumettre avec sécurité à l'étude cryoscopique, le poids moléculaire est le même, il correspond à la formule $(C^{12}H^{20}O^{10})^{20}$. Traitées par la diastase, les diverses dextrines fournissent, toutes choses égales d'ailleurs, des quantités variables de maltose ; ce caractère d'être plus ou moins facilement transformées en sucre est l'élément différentiel qui sert de base aux classifications établies par O'Sullivan et par Brown et Héron.

Déjà, dans leur mémoire de 1885, Brown et Morris ont montré que si on prend l'une quelconque des dextrines regardées primitivement par eux-mêmes comme des produits définis, on peut, au moyen de précipitations fractionnées à l'alcool, la séparer en plusieurs portions qui, traitées par la diastase, se comportent de façon différente : ils concluent que tous les produits obtenus par eux ou par leurs devanciers sont des mélanges constitués par l'union en proportions variables de huit dextrines dont ils prévoient théoriquement la formation, mais celles-ci elles-même n'ont plus dès lors qu'un caractère hypothétique, puisque en aucun cas elles n'ont été effectivement isolées.

Je vais entreprendre l'étude des dextrines en faisant abstraction de toute conception théorique ; pour les séparer j'emploierai les précipitations fractionnées à l'alcool. Afin d'obtenir des

résultats toujours comparables, j'ai adopté une technique constante : la solution aqueuse était concentrée au bain-marie, refroidie, additionnée d'alcool de façon que le titre alcoolique du mélange atteigne le chiffre voulu; je laissais déposer, je filtrais, le précipité resté sur le filtre était repris par l'eau, précipité à nouveau par l'alcool à la même concentration; l'opération était répétée jusqu'à ce qu'une nouvelle précipitation ne laisse plus de résidu dans les eaux-mères : les liquides alcooliques provenant des précipitations successives étaient réunis, concentrés et soumis après dosage de la matière dissoute aux précipitations ultérieures par l'alcool à dose plus élevée; au début de chaque fractionnement, la concentration du liquide aqueux était poussée jusqu'à un point calculé de façon que la teneur en substance dissoute du liquide aquo-alcoolique au sein duquel se forme le précipité fut voisine de 5 0/0; l'expérience m'a montré, en effet, que pour un même mélange, la proportion de matière qui reste en solution dans l'alcool à un titre donné n'était pas indépendante de la dilution. Les produits de la transformation de l'amidon seront ainsi séparés en plusieurs portions, l'une soluble dans l'alcool à 25 0/0, insoluble dans l'alcool à 30 0/0, l'autre soluble dans l'alcool à 30 0/0, insoluble dans l'alcool à 40 0/0 et ainsi de suite : nous aurons à nous demander quelle est la signification des distinctions ainsi établies.

50 grammes de fécule de pomme de terre, gélatinisés dans 10 litres d'eau, ont été traités à la température de 79-80° par une petite quantité d'amylase (toutes les fois que j'emploierai le terme « amylase », il s'agira d'amylase du malt précipitée par l'alcool), il ne s'est pas formé de sucre en quantité appréciable : les précipitations fractionnées à l'alcool ont donné :

Titre alcoolique du liquide.	Poids de subst. insoluble dans le mélange aquo-alcoolique. Ce poids est rapporté à 100 c. c. de subst. totale mise en œuvre.
—	—
30	4,2
35	20,6
40	63,5
45	71,3
50	78,1
60	88,1
70	92,7
80	96,2

Les dextrines qui restent dissoutes dans l'alcool à 70 0/0 constituent, après séchage, une poudre blanche se dissolvant facilement et abondamment dans l'eau froide ; l'iode ajouté à leurs

solutions y produit à peu près la même teinte que dans l'eau pure, ce sont des achroodextrines.

Les dextrines qui restent en solution dans l'alcool à 25 0/0, mais sont précipitées par l'alcool à 40 0/0, constituent une poudre blanche se dissolvant peu et difficilement dans l'eau froide, plus soluble dans l'eau chaude; leurs solutions froides sont toujours opalescentes, l'iode ajouté peu à peu produit une coloration d'un bleu pur; ce sont des amylodextrines.

Les dextrines qui sont restées dissoutes dans l'alcool à 55 0/0, mais ont été précipitées par l'alcool à 65 0/0, constituent une substance blanche se dissolvant facilement dans l'eau froide; les solutions sont limpides et l'iode y produit une coloration rouge; si l'iode est ajouté peu à peu, la teinte d'abord rouge pelure d'oignon vire au rouge foncé sans donner à aucun moment de nuance bleue ou violette; ce sont des érythrodextrines.

Pour certains auteurs, Salomon, Musculus, en particulier, les érythrodextrines n'auraient pas d'existence propre. Salomon explique la coloration rouge que produit l'iode par ce fait que l'amylodextrine, qui se colore en bleu lorsqu'elle est en solution aqueuse, se colorerait en rouge lorsqu'elle se trouve en présence d'une certaine quantité d'achroodextrine; c'est là une hypothèse à l'appui de laquelle son auteur n'apporte aucun fait précis. J'ai essayé d'obtenir un mélange colorable en rouge par l'union d'amylodextrines et d'achroodextrines: en vain j'ai fait varier les proportions des substances et leur état, en prenant les amylodextrines les plus solubles dans l'alcool, je n'ai jamais obtenu que des mélanges colorables en bleu. Pour Musculus, l'amylodextrine se colorerait en bleu lorsqu'elle est en solution concentrée, et en rouge lorsqu'elle est en solution étendue. En lisant avec attention le mémoire de Musculus, on voit qu'il donne arbitrairement le nom d'amidon soluble ou amylodextrine à un mélange complexe représentant le produit à peu près brut d'une saccharification peu avancée et où dominent les érythrodextrines. Si on prend l'amylodextrine bien isolée par les précipitations fractionnées à l'alcool, elle donne, quelle que soit la dilution, exclusivement du bleu : en ajoutant l'iode peu à peu on voit la teinte se foncer et virer au bleu noir, mais sans jamais donner de rouge ni de violet; d'autre part, les érythrodextrines délayées dans très peu d'eau donnent un liquide que l'iode colore exclu-

sivement en rouge. Si, au lieu de prendre les amylodextrines ou les érythrodextrines isolées, on prend les produits de la saccharification *in toto* après leur avoir fait subir le traitement sommaire de Musculus, qui les débarrasse des portions d'amidon non liquéfiées et des corps les plus solubles dans l'eau, on constate que la teinte varie suivant la proportion d'iode ajoutée : avec un peu d'iode elle est bleue, avec un excès d'iode elle vire au violet et au rouge. Sur des liquides contenant plus de 1 p. 100 de matière dissoute, le virage que je viens de signaler est difficile à saisir, il devient très net sur des dilutions à 1 p. 1000. L'expérience est facile à réaliser en faisant avec un même liquide des dilutions telles que la teneur en substance dissoute aille en décroissant à partir de 1 p. 1000 : la même quantité d'iode ajoutée à un même volume de ces dilutions donne une coloration bleue dans les premières, rouge dans les dernières; cette méthode des dilutions est très sensible, elle me fournira un criterium de pureté de l'amylodextrine, celle-ci sera déclarée pure quand elle ne donnera jamais que des teintes bleues. Les variations de teinte que nous venons d'observer tiennent sans doute à l'inégale affinité pour l'iode de la substance colorable en bleu et de la substance colorable en rouge: dans un mélange, c'est l'amylodextrine qui se teint d'abord ; la dilution modifie ces affinités au profit de l'érythrodextrine, si bien qu'on observe des changements analogues si on dilue, comme le faisait Musculus, le mélange d'iode et de dextrines, la coloration d'abord bleue vire au rouge.

L'érythrodextrine a donc une existence propre au même titre que l'amylodextrine et que l'achroodextrine, nous avons là trois substances faciles à isoler et à caractériser. J'ai volontairement laissé de côté les dextrines intermédiaires qui donnent à l'iode des teintes violettes : les teintes varient pour une même dextrine avec la proportion d'iode ; ceci éveille tout de suite l'idée d'un mélange et j'ai tenu à m'attacher tout d'abord aux substances que la réaction de l'iode pouvait faire considérer comme pures et homogènes : le sont-elles en effet? Voyons d'abord l'amylodextrine.

Dutrochet avait déjà constaté que l'empois d'amidon ne laisse rien diffuser au travers d'une cloison de porcelaine poreuse, il ne laisse à peu près rien passer non plus à la bougie

Chamberland ; si on essaie de la même façon l'amylodextrine obtenue par l'action ménagée de l'amylase, on constate qu'une partie traverse la bougie, tandis que l'autre est retenue ; si l'action de l'amylase a été prolongée davantage, l'amylodextrine passe intégralement.

1 litre d'empois à 2 0/0 de fécule a été traité à 79-80° par 0,05 d'amylase précipitée : le liquide concentré soumis aux précipitations fractionnées par l'alcool donne :

Alcool 0/0.	Poids de subst. précipitée 0/0.
—	—
30	42,2
40	81,5

La portion soluble dans l'alcool à 30 0/0, mais précipitée par l'alcool à 40 0/0, reprise par l'eau, fournit une solution qui, filtrée sur une bougie Chamberland, donne :

Substance dissoute en 100 c. c.	avant la filtration...	2,4
— —	après la filtration...	0,85

Le liquide essayé à l'iode par la méthode des dilutions avant et après la filtration donne, dans les deux cas, des teintes d'un bleu pur : l'amylodextrine a donc traversé la bougie, mais pas intégralement, les deux tiers environ ont été retenus.

Une deuxième opération a été conduite comme la précédente, mais le traitement par la diastase a été répété quatre fois, les précipitations à l'alcool donnent :

Alcool 0/0.	Substance précipitée p. 100.
—	—
30	5,6
40	59,4

La dextrine précipitée par l'alcool à 40 0/0 est reprise par l'eau ; la solution filtrée à la bougie donne :

Substance dissoute en 100 c. c.	avant la filtration...	2,9
— —	après la filtration...	2,5

L'iode, après comme avant filtration, indique la présence d'amylodextrine pure : celle-ci est passée presque tout entière au travers du filtre.

En étudiant la filtration au travers des parois de porcelaine, nous trouvons donc qu'il y a amylodextrine et amylodextrine : des considérations d'un autre ordre vont affermir et préciser cette notion.

Une transformation faite dans les conditions des expériences précédentes a fourni un liquide qui, par les précipitations fractionnées à l'alcool, donne :

Alcool 0/0.	Substance précipitée p. 100.
—	—
20	8,1
30	44,2
35	68,3
40	82,7
50	92,1
60	96,2

Considérons les deux fractions séparées, l'une α entre 20 et 30 0/0 d'alcool, l'autre β entre 35 et 40.

La dextrine α, dissoute dans la proportion de 1 0/0, donne une solution fortement opalescente, qui devient limpide à chaud, mais reprend son opalescence en se refroidissant, qui ne passe que très péniblement au travers de la bougie et en sort privée de la presque totalité de sa substance dissoute, qui par l'iode se colore en bleu intense : si à la solution colorée par l'iode on ajoute une petite quantité d'un sel neutre (1 0/0 de chlorure de sodium par exemple) ou de l'une des nombreuses substances signalées par Payen comme capables de précipiter l'iodure d'amidon, on voit l'iodure bleu se rassembler en quelques heures au fond du vase et se rétracter ensuite à la façon d'un coagulum de caséine ; il laisse au-dessus de lui un liquide limpide, incolore et qui, si la quantité d'iode introduite est suffisante, ne contient plus d'amylodextrine.

L'amylodextrine α se comporte donc comme l'empois non traité par la diastase, il faut seulement une dose de sel un peu plus élevée pour produire la coagulation de l'iodure.

La portion β donne des solutions qui, limpides à chaud, le restent à froid si elles ne sont pas trop concentrées ; ces solutions traversent la bougie sans modification notable, elles se colorent exclusivement en bleu par l'iode. Mais l'addition du chlorure de sodium, même à la dose de 20 0/0, ne détermine la formation d'aucun précipité.

Je n'ai cité que quelques expériences choisies parmi beaucoup d'autres, toutes conduisent aux mêmes conclusions : il n'y a pas qu'une amylodextrine. Parmi les substances colorables en

bleu que précipite l'alcool faible, les unes donnent des solutions laiteuses, qui ne traversent pas les parois de porcelaine, qui fournissent un iodure facilement coagulable par les sels neutres et se rapprochent ainsi de l'empois ; les autres donnent des solutions qui filtrent sans altération et fournissent un iodure incoagulable, elles se rapprochent des érythrodextrines.

Après ce que nous venons d'apprendre, nous sommes portés à penser qu'il n'y a pas plus d'homogénéité dans les groupes de l'érythrodextrine et de l'achroodextrine que dans celui de l'amylodextrine ; pour éclaircir ce point, nous allons étudier, au point de vue de leur résistance à l'amylase, les différentes fractions isolées par l'alcool, depuis les amylodextrines jusqu'aux achroodextrines solubles dans l'alcool fort.

L'expérience suivante a été faite avec une dextrine incolorable par l'iode isolée des produits fournis par une saccharification déjà avancée, ceux-ci comprenaient :

Maltose	60,2
Dextrine	39,8

La plus grande partie du sucre est éliminée par des précipitations dans l'alcool à 95 0/0, et il reste un mélange de :

Maltose	7,3
Dextrine	92,7

Les fractionnements par l'alcool donnent :

La portion	A	précipitée par l'alcool à 60 0/0		contient	22,4 de dextrine	et	0,6 de maltose.
—	B	sol. dans alc. à 60	Préc. par alc. à 70	—	26,3	—	0,9 —
—	C	— 70	— 80	—	32,3	—	3,2 —
—	D	— 80	—		9,2	—	2,3 —

Ces diverses fractions sont dissoutes dans l'eau et les solutions sont additionnées de maltose, de façon que chacune d'elles contienne dans 100 c. c. :

Maltose	4,2
Dextrine	5,0

Toutes ces solutions sont traitées simultanément et dans les mêmes conditions par la diastase à 63°. Les quantités de maltose formé pour 100 de dextrine mise en œuvre ont été :

Fraction A	20,5
— B	37,6
— C	75,3
— D	97,2

La dextrine totale traitée dans les mêmes conditions par la diastase a donné 53,7 0/0 de maltose, au lieu de 52,8 qu'a donné l'ensemble des fractions.

Notre achroodextrine n'était donc pas homogène, et il est bien clair, en outre, que les divisions que nous avons établies sont arbitraires et qu'il n'y a aucune raison de penser que les parties soient plus homogènes que le tout.

Une saccharification faite à 78° a fourni un mélange contenant :

Maltose	4,5
Dextrine............................	95,5

Ce mélange a été fractionné par l'alcool, et j'ai traité dans les mêmes conditions, par la diastase à 63°, d'une part les diverses fractions redissoutes dans l'eau, d'autre part une partie du mélange primitif. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous :

La portion précipitée par l'alcool à		35 0/0	représente	5,1 0/0	de la masse totale, elle a donné.........	20.1 0/0	de son poids en maltose.
La port. sol. en alc. à 35 0/0 précipitée par alcool à...........		40	—	35,3	—	50,5	—
—	40	— 50	—	29,7	—	61,1	—
—	50	— 60	—	11,3	—	75,6	—
—	60	— 70	—	6,8	—	89,5	—
—	70	— 80	—	3,9	—	98,3	—

La dextrine du mélange primitif a donné 57,8 0/0 de sucre au lieu de 55,4 qu'a donné celle de l'ensemble des fractions.

L'expérience précédente embrasse toute la série des dextrines, elle montre que la résistance à la diastase n'est pas plus constante dans la région des érythrodextrines que dans celle des achroo ou des amylodextrines, et que, dans chaque solution amylacée en voie de saccharification, se trouve une série de corps dont toutes les propriétés connues varient d'une façon graduelle : la chaîne ainsi formée va depuis les amylodextrines très voisines encore de l'état d'empois jusqu'aux achroodextrines solubles dans l'alcool fort, facilement et intégralement transformables en maltose.

A quel ordre de faits physiques ou chimiques convient-il de rattacher les différences relevées entre les dextrines? Les expériences de Brown et Morris prouvent que, au moins dans les érythrodextrines et les achroodextrines, le poids moléculaire reste invariable et voisin de 6,000.

L'amylodextrine ou plus exactement « l'amidon soluble » semblerait posséder un poids moléculaire beaucoup plus élevé, il serait égal à 18,000 d'après Lintner, à 24,000 d'après Brown et Morris. Mais les savants anglais font observer eux-mêmes qu'ici la cryoscopie perd toute autorité ; ils disent en effet :

« Bien que différentes expériences aient donné des résultats concordants, d'après lesquels le poids moléculaire de l'amidon serait compris entre 20.000 et 30,000, les erreurs d'expérience sont si importantes relativement à la valeur absolue des nombres observés qu'il est impossible d'accorder quelque confiance aux résultats, quelque soin qu'on ait apporté dans la conduite des expériences. » De mon côté, je me suis proposé de déterminer les points de congélation de solutions d'amylodextrine faites avec les produits isolés par l'alcool. Les amylodextrines les plus solubles dans l'alcool, celles qui passent au travers de la bougie Chamberland et dont l'iodure n'est pas coagulé par NaCl donnent des solutions qui peuvent être congelées à la condition que la concentration ne dépasse pas 2 ou 3 0/0 ; pour des concentrations plus fortes une partie de la substance dissoute se sépare à 0° et ne se redissout pas quand la masse revient à la température ordinaire ; avec des solutions à 2 0/0 l'abaissement du point de congélation est encore trop au-dessous des erreurs d'expérience pour que le poids moléculaire auquel il conduirait puisse être accepté, même comme une indication. Les amylodextrines les moins solubles dans l'alcool sont précipitées de leurs solutions, même très étendues, dès qu'on les soumet à la congélation, elles se prêtent moins encore que les autres à des déterminations cryoscopiques. En réalité donc, relativement à la grosseur de la molécule d'amylodextrine, la cryoscopie ne dit rien et je montrerai plus loin que le phénomène qui conduit d'une achroodextrine à l'autre n'est que la continuation de celui qui conduit de l'amidon à l'amylodextrine, de celle-ci à l'érythrodextrine et de cette dernière à l'achroodextrine, je ne vois aucune raison d'admettre qu'il se produit des dédoublements moléculaires au début, alors que sûrement il ne s'en produit pas à la fin.

Relativement à la coloration par l'iode, les expériences de Payen ont montré que les propriétés de ne pas se colorer par l'iode, ou de donner avec ce réactif une teinte déterminée, sont liées à des changements d'état qui ne dépassent pas ceux que peut amener une modification dans le degré de cohésion de la substance.

Nous savons aussi par des expériences de Payen que si les grains d'amidon sont très petits, l'empois qu'ils donnent fournit

un iodure difficile à coaguler; celui-ci, au contraire, se précipite facilement s'il provient d'amidon à grains très gros (on suppose que dans les deux cas le même poids d'amidon a été gélatinisé dans le même volume d'eau). La différence tient évidemment à la façon plus ou moins parfaite dont la substance amylacée se trouve distendue au sein du liquide.

La différence des résistances à la diastase peut aussi être rapportée à des différences d'ordre physique, comme je le montrerai plus loin.

Enfin le fait d'être précipitables par l'alcool à une concentration plus ou moins élevée et de traverser plus ou moins facilement les parois de porcelaine n'éveille pas l'idée d'un changement survenu dans la constitution de la molécule chimique.

Si nous mettons toutes les considérations précédentes en regard du fait que pour tous les produits de la saccharification intermédiaires entre l'amidon et le sucre, la composition centésimale et le pouvoir rotatoire sont constants, nous sommes autorisés à conclure que les différences observées ne dépassent pas celles que peut expliquer un changement d'état physique, modifiant les relations des molécules entre elles, mais laissant intact leur édifice. Nous allons voir cette conclusion préliminaire s'affirmer en étudiant la dextrinisation.

II

DEXTRINISATION

On admet aujourd'hui que le dédoublement moléculaire qui constituerait l'acte même de la saccharification serait précédé par la liquéfaction de l'empois, celle-ci se réduisant à la disparition de l'état muqueux; l'indépendance de la liquéfaction et de la saccharification a été acceptée parce que, manifestement, on peut obtenir la première en dehors de la seconde, et que si on se borne à apprécier le changement d'aspect de l'empois, le phénomène prend une allure très nette : aux températures élevées où la saccharification est pénible, la liquéfaction se produit plus rapidement qu'aux températures basses et elle n'est accompagnée d'aucune formation de sucre. Mais si on y regarde de plus près, les choses sont loin de paraître aussi simples. Toutes les parties

d'un empois liquéfié ne sont pas dans le même état : les unes sont à peine décoagulées; les autres sont au contraire loin de leur état primitif; entre celles-ci et les érythrodextrines, nous ne savons établir aucune démarcation précise, pas plus, d'ailleurs, qu'entre les érythrodextrines et les achroodextrines : où s'arrête la liquéfaction proprement dite? où commence la dextrinisation? La théorie de Musculus répond : la dextrinisation commence avec la production du sucre. Je vais démontrer qu'il n'en est rien, et que l'on peut aller de l'amidon à l'achroodextrine par un phénomène continu, indépendant de toute formation de sucre à la fin comme au début.

Suivons la marche de la dextrinisation par les précipitations fractionnées à l'alcool. En opérant à la température de 80°, voisine de celle où la diastase cesse d'agir, j'ai pu obtenir une dextrinisation très avancée sans qu'il se forme de sucre : il suffit pour cela de maintenir le liquide diastasifère à 80° pendant un temps convenable avant de l'ajouter à l'empois : lorsqu'on opère la transformation en ajoutant le liquide diastasifère à l'empois aussitôt que l'un et l'autre ont atteint la température de l'expérience, on observe toujours la production d'un peu de sucre, mais celle-ci est limitée aux premiers instants de la réaction, elle est arrêtée que la dextrinisation se poursuit encore.

Les expériences suivantes ont été faites en traitant à 80° un certain volume d'empois de fécule (5 grammes de fécule de pomme de terre dans un litre d'eau) par des affusions successives d'extrait de malt; celui-ci était maintenu au préalable pendant 5 minutes à 80° et ajouté chaque fois dans la proportion de 4 c. c. pour 100 c. c. d'empois, les affusions étaient faites de 10 minutes en 10 minutes ; le liquide était ensuite filtré, concentré au bain-marie et soumis aux précipitations fractionnées par l'alcool; dans la solution aqueuse concentrée, j'ai dosé le sucre par la liqueur de Fehling, la quantité trouvée a été rigoureusement égale à celle qu'avait apportée l'extrait de malt.

I. Une seule affusion d'extrait de malt a donné :

Matière totale en solution	18,4
Matière soluble dans l'alcool à 70 0/0	1,0

La substance soluble dans l'alcool à 70 0/0 est de l'achroodextrine.

II. Sept affusions d'extrait de malt ont donné :

Matière totale en solution	17,44
Matière soluble dans l'alcool à 70 0/0	3,00

La substance soluble dans l'alcool à 70 0/0 est de l'achroodextrine.

L'expérience suivante a été faite avec une solution d'amylase précipitée par l'alcool.

0gr,1 d'amylase était dissous dans 100 c. c. d'eau et chaque affusion se faisait à raison de 20 c. c. de solution pour 1 litre d'empois : les précipitations à l'alcool ont donné :

Matière totale dissoute	15,8
Matière soluble dans l'alcool à 70 0/0 après 2 affus.	1,3
— — — — — 4 —	2,0
— — — — — 6 —	2,4
— — — — — 8 —	2,5

Le liquide à la fin de l'opération ne contenait pas de sucre.

Il est donc parfaitement établi que la production des dextrines est indépendante de la production de sucre ; nous pouvons faire un pas de plus et prouver que la saccharification et la dextrinisation correspondent à deux propriétés distinctes et dissociables de l'amylase ; je vais montrer, en effet, que par l'action ménagée de la chaleur on peut, en partant de l'extrait de malt ou de la solution d'amylase, obtenir un liquide qui dextrinise encore, mais qui ne saccharifie plus.

J'ai chauffé à 80° pendant des temps variables chaque fois 50 c. c. d'extrait de malt qui étaient ensuite versés rapidement dans 100 c. c. d'empois à 3 0/0 de fécule froid, la température du mélange tombait au voisinage de 50° ; je plaçais celui-ci dans un bain-marie à 60° et je laissais la transformation s'achever.

Dans les tableaux qui suivent, les nombres de la colonne A indiquent la proportion de sucre formé rapportée à 100 de matière dissoute, ceux de la colonne B la quantité de dextrine soluble dans l'alcool à 70 0/0.

Temps de chauffe à 80° en minutes.	A	B
5	80	20
10	53	40
20	21	50
25	12	24
30	2	14
35	0	10
40	0	6
45	Liquéfaction incomplète.	

Après un chauffage de 35 minutes le pouvoir saccharifiant est détruit, tandis que le pouvoir dextrinisant persiste : le temps de chauffe au bout duquel ce dédoublement des propriétés est obtenu varie, du reste, avec la nature de l'extrait de malt employé ; un extrait traité dans les conditions de l'expérience précédente a donné :

Temps de chauffe à 80° en minutes.	A	B
5	67	33
10	20	50
15	1	10
20	0	5

dans ce cas le pouvoir saccharifiant a disparu dès la quinzième minute ; toutes les fois qu'on voudra répéter l'expérience à coup sûr, il faudra faire des essais en série.

Les expériences suivantes ont été faites avec de l'amylase précipitée :

I. La solution d'amylase maintenue pendant le temps voulu à 80° était versée dans un volume égal d'empois à 3 0/0 de fécule froid, le mélange était ensuite maintenu à 60° jusqu'à ce que la transformation fût arrivée à son terme.

Temps de chauffe à 80° en minutes.	A	B
1	63	27
2	25	75
5	4	30
10	0	15
15	Liquéfaction incomplète.	

II. 1,500 c. c. d'empois à 2 0/0 de fécule ont été traités à 60° par huit affusions de 150 c. c. de la solution diastasique qui a servi pour l'expérience précédente, la diastase était préalablement chauffée pendant 10 minutes à 80°, les affusions étaient faites d'heure en heure : le mélange soumis aux précipitations fractionnées à l'alcool a donné :

	Poids 0/0 de substance qui reste en solution.		
Alcool 0/0.	Après 2 affus.	Après 4 affus.	Après 8 affus.
40	»	»	88,1
60	»	»	40,2
70	10,3	15,2	17,8

Il n'y a pas eu production de sucre : après les huit affusions la substance qui reste en solution dans l'alcool à 60 0/0 se colore en rouge par l'iode, celle qui reste en solution dans l'alcool à 70 0/0 est de l'achroodextrine.

Il est aujourd'hui admis que les diverses dextrines ont un pouvoir réducteur nul et un pouvoir rotatoire égal à celui de l'amidon ; cette notion résultait des recherches de Brown et Héron, de O'Sullivan, de Effront ; elle se déduit bien plus simplement et sans contestation possible des expériences suivantes :

Je prépare un empois en précipitant la fécule de pomme de terre (1 à 2 gr. pour 100 c. c. d'eau), dans l'eau portée à 95°, l'amidon se gélifie aussitôt, je le maintiens à 95° pendant 1/2 heure environ, puis je le porte à 120°

dans un autoclave pendant 1 heure ; l'empois ainsi obtenu est très légèrement opalescent et suffisamment transparent pour être examiné sans peine au polarimètre dans un tube de deux décimètres : traité à 80° par la diastase ou à 60° par la diastase chauffée, cet empois est transformé partiellement en dextrine sans que son pouvoir rotatoire varie.

L'expérience suivante a été faite en traitant à 60° par l'extrait de malt chauffé à 80° un empois transparent à 1 0/0.

Rotation α_D avant le traitement........	3° 38'
— — après —	3° 38'

Les précipitations fractionnées à l'alcool ont isolé trois portions.

Portion *a*. Précipitée par l'alcool à 60 0/0, la solution se colore en bleu par un peu d'iode, en violet brun par un excès.

Portion *b*. Reste en solution dans l'alcool à 60 0/0, est précipitée par l'alcool à 70 0/0 ; les solutions par des quantités croissantes d'iode donnent d'abord un rouge clair, puis un rouge brun foncé.

Portion *c*. Reste en solution dans l'alcool à 70 0/0. L'iode ajouté aux solutions produit à peu près la même teinte que dans l'eau pure.

Il n'y a pas eu production de sucre réducteur.

Les poids respectifs des portions *a*, *b*, *c* ont été :

a....................................	10,6
b....................................	2,7
c....................................	2,9

Les substances ainsi isolées, dissoutes dans l'eau à raison de 3 gr. pour 100 c. c., traitées à 60° par l'extrait de malt frais, ont donné en maltose pour 100 de dextrine :

a....................................	71
b....................................	82
c....................................	95

L'expérience précédente prouve de la façon la plus nette que les produits intermédiaires entre l'amidon et le maltose ont un pouvoir rotatoire égal à celui que possède l'amidon dans le granule simplement distendu par l'eau.

Le procédé que je viens d'indiquer pour obtenir des empois transparents, et susceptibles d'être examinés au polarimètre dans des conditions de précision suffisante, fournit un moyen de comparer entre eux, au point de vue du pouvoir rotatoire, les amidons d'origine différente, c'est une étude que je me propose de faire ultérieurement.

Il aurait été intéressant de rattacher le dédoublement de l'amylase aux phénomènes d'ordre connu qui peuvent se passer au sein du liquide diastasifère chauffé. Lorsqu'on chauffe l'extrait de malt, on voit se former un coagulum qui bientôt se dépose, laissant au-dessus de lui un liquide limpide ; la diastase peut

être soit coagulée, soit entraînée par collage sur le coagulum : je me suis proposé de suivre comparativement la marche de la coagulation et celle de la destruction de la diastase.

Pour chaque essai, 200 c. c. d'un même extrait de malt ont été maintenus à 80° pendant un temps déterminé, rapidement refroidis, abandonnés à eux-mêmes pour laisser le coagulum se déposer, filtrés; je pesais le coagulum recueilli sur un filtre et séché, et je mesurais l'activité saccharifiante du liquide filtré : celle-ci était évaluée d'après la quantité de sucre qui prenait naissance lorsque je faisais agir à 60°, 20 c. c. du liquide sur 100 c. c. d'un empois à 3 0/0 de fécule; les nombres du tableau ci-dessous expriment les activités observées en supposant égale à 100 l'activité de l'extrait de malt avant le chauffage.

Temps de chauffage en min.	Poids du coagulum.	Activité saccharifiante.
5	0,42	90,5
10	0,51	42,3
20	0,51	10,1
30	0,51	0

Nous voyons que la plus grande partie de la substance coagulable est précipitée alors que la diastase est peu attaquée : d'autre part, lorsqu'on chauffe une solution d'amylase, celle-ci est détruite sans qu'il se forme de précipité appréciable : il ne semble donc pas que le rôle important dans la destruction de la diastase doive être attribué aux phénomènes de coagulation.

Pour tous les phénomènes de l'ordre de ceux qui nous occupent, on doit nécessairement songer aux oxydations, auxquelles les diastases sont si sensibles et dont l'importance biologique devient chaque jour plus apparente. Déjà aux températures inférieures à 70° les solutions d'amylase perdent peu à peu leur activité, et l'oxygène intervient dans cette altération d'une façon non douteuse.

Un même extrait de malt a été réparti d'une part dans des tubes qui ont été fermés à la lampe vides d'air, d'autre part dans des tubes semblables qu'on a placés à côté des premiers dans un bain-marie réglé à 65° et qui ont été parcourus pendant toute la durée de l'expérience par un courant d'oxygène pur passant bulle à bulle ; on avait ajouté dans chaque tube un dix-millième d'aldéhyde formique pour se mettre à l'abri des microbes. Le pouvoir saccharifiant a été mesuré par la quantité de sucre obtenu en traitant à 60° pendant 1/4 d'heure, 100 c. c. d'empois à 3 0/0 de fécule par 10 c. c. de l'extrait à essayer.

Temps de chauffe en heures.	Série vide.	Série oxygénée.
1	78,2	75,2

5	75,1	36,1
10	56,4	Liquéfact. incomp.
15	30,1	
20	Liquéf. incomp.	
25	Pas de liquéf.	

Aux températures plus élevées les choses se passent de même, seulement la destruction de la diastase est plus rapide; l'expérience suivante a été faite dans les mêmes conditions que celle qui précède mais avec de l'amylase précipitée et à la température de 78-80.

Temps de chauffe en min.	Série vide.	Série oxygénée.
1	78,2	64,5
2	30,1	19,2
5	12,5	0
10	7,0	0
15	0	0

Aux températures supérieures à 80° la destruction de la diastase est presque instantanée et j'ai toujours vu l'extrait de malt devenir incapable de liquéfier l'empois après un séjour de quelques secondes à 85°.

En résumé. dans les modifications que subit l'amylase aux températures élevées, les phénomènes de coagulation paraissent jouer un rôle secondaire, les phénomènes d'oxydation, au contraire. paraissent jouer un rôle important ; quoi qu'il en soit de l'importance relative de ces deux ordres d'influences il résulte de ce que nous avons appris au cours de ce chapitre :

1° Que la transformation qui conduit de l'amidon à la dextrine et celle qui conduit de la dextrine au sucre sont deux phénomènes distincts :

2° Que chacun de ces deux phénomènes correspond à une propriété spéciale de l'amylase, ce qui revient à dire que celle-ci est un mélange de deux diastases, l'une dextrinisante, l'autre saccharifiante.

III

LA SACCHARIFICATION

Ce que j'ai dit au chapitre précédent prouve que la théorie de la saccharification, telle qu'elle est actuellement admise, ne

saurait être conservée : il faut en revenir aux conceptions de Payen qui admettait, bien qu'il ne fût pas arrivé à les isoler en fait, deux phénomènes successifs et indépendants. Mais ce point une fois acquis, nous nous trouvons dans la nécessité de chercher une explication nouvelle pour tout un ensemble de faits qui ont servi de fondement à la théorie de Musculus, et que n'expliquait pas la théorie de Payen telle que celui-ci l'avait formulée.

Si on suit la marche de la production du sucre aux températures supérieures à 50°, on constate qu'elle se fait en deux temps assez nettement tranchés : très rapide dans les 10 à 15 premières minutes, elle s'arrête brusquement et ne se continue plus qu'avec une lenteur extrême.

Le ralentissement du phénomène ne peut être attribué à l'usure de la substance active, puisque l'addition de nouvelles quantités de diastase n'entraîne aucune accélération appréciable : il ne peut pas davantage être rapporté, comme le croyait Payen, à l'influence gênante du sucre formé. La présence du maltose intervient, comme l'a montré Lindet, pour retarder la saccharification des dextrines, mais son action est tout à fait insuffisante pour expliquer l'arrêt presque complet que nous avons constaté. D'ailleurs des expériences directes ont montré que l'empois d'amidon, ajouté dans un liquide où la saccharification paraît être arrivée à son terme, est transformé sinon aussi vite, du moins aussi complètement que l'empois primitif, et que d'autre part l'addition préalable d'une quantité de maltose égale à celle qui doit se former au cours de l'opération, était sans influence notable sur la marche de celle-ci et sur le terme auquel elle s'arrête, pourvu toutefois que les solutions sur lesquelles on opère ne soient pas trop concentrées. Le facteur qui intervient surtout pour arrêter la saccharification est la résistance spéciale que présentent vis-à-vis de la diastase les dextrines résiduelles. Les partisans de la théorie du dédoublement moléculaire ont tiré leurs arguments de ces faits, et proposé, pour les expliquer, des théories dont M. Duclaux a fait, dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, une critique sur laquelle je ne reviendrai pas.

Débarrassés de l'appareil des formules, les faits qu'il nous faut interpréter peuvent se résumer ainsi : Dans toute saccharification arrivée au moment où elle se ralentit au point d'être pratiquement arrêtée, il reste des dextrines : celles-ci, si on les

isole et si on les soumet à l'action de la diastase, se montrent plus résistantes que l'empois dont elles dérivent : elles donnent, toutes choses égales d'ailleurs, d'autant moins de sucre qu'elles proviennent d'une saccharification plus avancée.

Rappelons-nous deux notions que nous avons acquises dans les chapitres précédents. Brown et Morris ont établi, et je l'ai vérifié à maintes reprises, que si on prend une quelconque des dextrines que l'on peut isoler du mélange fourni par une saccharification, il est possible de la séparer par des fractionnements à l'alcool en plusieurs portions qui, traitées simultanément et dans les mêmes conditions par la diastase, présentent des résistances très différentes; d'autre part j'ai montré que les dextrines, obtenues par l'action de la dextrinase en dehors de toute production de sucre, présentaient ce même caractère de mélanges et étaient susceptibles d'être scindées en portions de résistances différentes. L'existence de substances plus ou moins facilement attaquables est donc antérieure à la formation du sucre : il y a lieu de se demander si elle n'est pas antérieure même à la formation des dextrines, et si la raison des différences observées ne doit pas être recherchée plus haut, dans un défaut d'homogénéité de l'empois dérivant de la non homogénéité certaine du granule d'amidon : c'est ce point que nous allons tenter d'éclaircir.

On sait que lorsque des granules d'amidon non gélatinisés sont soumis à l'action de l'amylase, ils sont partiellement dissous, les uns dès la température ordinaire comme ceux de froment, les autres seulement à température plus élevée comme ceux de pomme de terre : nous allons étudier un peu en détail comment les choses se passent avec l'amidon de froment.

Pour chacune des deux expériences qui suivent, j'ai délayé 200 grammes d'amidon de froment dans 800 c. c. d'eau distillée et j'ai mis le tout au bain-marie; quand l'équilibre de température a été atteint, j'ai ajouté 200 c. c. d'extrait de malt préalablement porté à la température du bain.

A intervalles réguliers j'ai puisé 50 c. c. du mélange qu'un agitateur à palettes maintenait constamment homogène ; les 50 c. c. ainsi prélevés étaient aussitôt jetés dans 25 c. c. d'une solution à 3 p. 1000 de potasse maintenue au voisinage de 0°; la potasse arrêtait immédiatement l'action de la diastase, mais elle était en proportion trop faible et à température trop basse pour pouvoir exercer une action nuisible sur les produits dissous ; je filtrais et je dosais la quantité de matière en solution dans la prise d'essai, j'en déduisais celle qui à la même époque était dissoute dans la totalité du

liquide mis en expérience. Les nombres du tableau ci-dessous représentent les poids de matière entrée en solution, rapportés à 100 d'amidon sec traité.

Durée de la digestion en minutes.	Digestion à 55°.	Digestion à 60°.
5	26,8	44,8
10	37,1	55,2
20	41,1	61,3
40	43,0	63,2
120	44,1	64,1

La solubilisation des granules d'amidon, très rapide dans les premiers instants, se ralentit bientôt, ce ralentissement peut être rattaché à trois ordres d'influences ;

1° Affaiblissement de la diastase;

2° Influence retardatrice des produits déjà dissous ;

3° Résistance de plus en plus grande des portions non dissoutes.

1° Ce que nous savons de l'amylase ne rend guère vraisemblable l'hypothèse d'un affaiblissement de ses propriétés dans les 10 premières minutes de son action aux températures de 55° et 60°, et cette cause de retard pourrait être écartée *a priori*, il est d'ailleurs facile de constater directement qu'elle est de nulle importance.

Le liquide provenant d'une digestion faite à 55° pendant 1 heure de 20 grammes d'amidon dans 100 c. c. d'un mélange en parties égales d'eau et d'extrait de malt est filtré, puis partagé en deux portions d'égal volume. L'une, A, est portée à l'ébullition et reçoit ensuite la moitié de son volume d'extrait de malt frais ; l'autre, B, reçoit la moitié de son volume d'extrait de malt bouilli. Les deux portions se trouvent ainsi dans le même état, avec cette différence que la substance encore active est en A de la diastase fraîche, en B de la diastase ayant déjà agi pendant 1 heure; dans chacun des liquides A et B je fais digérer pendant 1 heure à 55° de l'amidon de froment à raison de 20 grammes pour 100 c. c. Les quantités de matière entrées en solution, rapportées à 100 grammes d'amidon sec mis en œuvre, ont été :

Portion A	44,2
— B	44,8

Ainsi donc, le ralentissement de la solubilisation n'est pas imputable à l'usure de la diastase.

2° La présence des produits déjà dissous a sur la marche ultérieure de l'attaque une influence des plus manifestes.

J'ai fait digérer pendant 1 heure à 55° un mélange contenant :

Eau distillée	120 c. c.
Extrait de malt	80 c. c.
Amidon de froment	80 grammes.

Le liquide filtré, porté à l'ébullition, refroidi, ramené au volume initial par addition d'eau distillée contient, dans 100 c. c., 16g,2 de substance dissoute provenant de l'amidon : trois flacons ont reçu :

	Eau distillée.	Liquide de la première digestion.	Extrait de malt bouilli.
	—	—	—
Flacon *a*	0	100	0
— *b*	48	40	12
— *c*	80	0	20

Dans chaque flacon, j'ai ajouté en outre 20 c. c. d'extrait de malt frais, puis 20 grammes d'amidon de froment, et j'ai fait digérer pendant 1 heure à 55°; les quantités d'amidon dissous ont été :

Flacon *a*	3g,7
— *b*	5g,3
— *c*	6g,4

La seule inspection des nombres ci-dessus montre bien que si l'intervention des substances dissoutes gêne la dissolution ultérieure, elle ne suffit pas à expliquer l'arrêt brusque et presque total que nous avons observé. Celui-ci doit être rapporté, pour la plus grosse part, à la résistance de plus en plus grande qu'offrent les portions non dissoutes : l'expérience directe prouve qu'il en est bien ainsi.

100 grammes d'amidon de froment contenant 83g,1 de substance sèche ont été traités à 60° par des digestions successives de 1 h. dans un mélange contenant, pour 400 c. c. d'eau, 100 c. c. d'extrait de malt ; après chaque opération la masse était filtrée, le résidu resté sur le filtre était lavé par trois macérations de 1/4 d'heure dans 500 c. c. d'eau à 55°; les eaux de lavage étaient ajoutées au liquide de la première filtration, le tout était concentré au bain-marie, et dans la solution ainsi obtenue je dosais la substance empruntée à l'amidon ; le résidu resté sur le filtre, dont la teneur en matière sèche était évaluée par différence, était mis à digérer de nouveau dans un mélange fait de façon que les proportions relatives d'eau de diastase et d'amidon fussent les mêmes que pour la première digestion, et le mélange était traité comme la première fois ; les digestions successives étaient faites ainsi toutes de la même façon.

Les nombres du tableau ci-dessous indiquent la quantité de substance dissoute au cours de chaque digestion, ce poids est rapporté à 100 de substance sèche mise en œuvre dans la digestion correspondante :

1re digestion	60,5
2e digestion	37,0
3e digestion	20,7
4e digestion	10,0

A mesure que la quantité de matière empruntée à l'amidon devient plus considérable, les résidus deviennent de moins en moins faciles à attaquer.

Les granules qui composent l'amidon de froment sont de grosseurs différentes ; les uns gros, ovalaires, présentent des stries concentriques presque aussi nettes que celles des grains de fécule ; les autres petits, polyédriques, brillants, ont l'aspect de cristaux légèrement arrondis : si on suit sous le microscope la marche de l'attaque par la diastase, on voit les gros grains disparaître, leur partie centrale distendue fait crever les couches externes, puis se dissout, et il ne reste en fin de compte que quelques débris informes. Les grains polyédriques les plus gros sont moins rapidement et moins profondément attaqués, ils conservent leurs contours nets, à peine corrodés, mais ils sont creusés à leur partie centrale d'un cratère profond à bords déchiquetés. Quant aux grains polyédriques les plus petits, ils sont encore moins atteints, et quelques-uns semblent, même après les dernières digestions, être restés intacts, ils ont conservé leur aspect brillant. Il est manifeste que les divers granules d'un même amidon présentent vis-à-vis de la diastase des résistances très variables, et qu'il en est de même pour les différentes parties d'un même granule ; ces différences, dont la théorie de Musculus ne tient aucun compte, me paraissent présenter une importance capitale, et c'est à elles qu'il faudra rapporter toutes les particularités de la saccharification qu'on avait tenté d'expliquer par des dédoublements moléculaires.

Nous allons examiner comment se comportent, après gélatinisation, les résidus que nous avons appris à préparer en poussant plus ou moins loin la dissolution des granules par la diastase.

J'ai traité de la même façon, à 60°, après gélatinisation dans des conditions identiques, d'une part de l'amidon de froment, d'autre part les résidus obtenus en dissolvant des proportions plus ou moins considérables de ce même amidon : le résidu A qui a servi aux expériences suivantes représentait 9,5 0/0 de l'amidon primitif.

I. Deux empois à 3 p. 100 d'amidon, faits à 90°, traités simultanément à 60° par la même quantité de diastase, ont donné :

	Poids de subst. entrée en solution pour 100 d'amidon gélatinisé.
Amidon entier	92,1
Résidu A	70,2

II. Deux empois à 3 0/0 ont été faits et saccharifiés dans les conditions de l'expérience précédente. Les nombres du tableau ci-dessous indiquent la proportion de sucre formée, rapportée à 100 de matière dissoute :

Temps en minutes.	Amidon entier.	Résidu A.
—	—	—
5	43,6	15,0
10	67,3	21,2
20	78,0	33,7
40	80,1	42,1
60	80,2	43,0
120	80,9	43,0

L'empois fait avec l'amidon résiduel se saccharifie moins vite et donne en définitive moins de maltose que l'empois fait avec l'amidon entier. L'expérience suivante a été faite avec de l'amidon de pomme de terre.

Le résidu obtenu par des traitements successifs de la fécule par la diastase à 55° représentait 20,2 0/0 de l'amidon primitif : la saccharification faite à 60° des deux empois préparés à 80° a donné :

	Maltose p. 100 de matière dissoute.
	—
Amidon entier........	79.3
Amidon résiduel.................	60.2

Ces expériences prouvent que les portions de l'amidon les plus difficiles à dissoudre donnent, après gélatinisation, les empois les plus difficiles à saccharifier, mais les indications qu'elles fournissent doivent être complétées. Un empois fait avec de l'amidon de froment, traité par la diastase à 60°. donne un liquide qui contient, pour 100 grammes de matière dissoute. environ 80 grammes de maltose et 20 grammes de dextrine, c'est donc le cinquième de la substance amylacée qui est resté à l'état de dextrine ; en saccharifiant un empois fait avec de l'amidon résiduel qui représentait seulement 9,5 0/0 de l'amidon primitif, nous avons obtenu 43 0/0 de maltose : nous ne pouvons donc pas admettre d'emblée que les dextrines qui restent non transformées dans le cas de l'amidon complet sont précisément celles qui correspondent aux portions les plus résistantes du granule, car autrement le résidu A des expériences précédentes n'aurait pas dû donner de maltose. L'attaque de l'amidon non gélatinisé est irrégulière, comme en témoignent les bords déchiquetés du granule et du cratère central, les couches d'inégale

résistance sont certainement un peu entremêlées, et il est possible que des portions peu résistantes échappent à l'action de la diastase par suite de leur position, enclavées qu'elles sont dans des couches plus résistantes qui restent indissoutes et qui les protègent.

Toutefois il ne me paraît pas qu'il faille chercher de ce côté l'explication que nous cherchons, nous allons la trouver en regardant du côté de la gélatinisation.

En suivant sous le microscope la gélatinisation des granules d'amidon délayés dans l'eau et chauffés progressivement, on constate que les portions internes se gonflent d'abord; elles font éclater les couches externes, font hernie, puis disparaissent dans le liquide, en sorte que les portions externes, celles qui sont le plus fortement agrégées, se trouvent, au moment où elles se gélatinisent à leur tour, en présence non pas d'eau pure, mais d'un véritable empois; or, dans ce cas, la gélatinisation est imparfaite et donne un empois difficile à saccharifier.

J'ai préparé deux mélanges constitués de la façon suivante : 1° mélange A, j'ai ajouté 50 c. c. d'un empois à 3 0/0 d'amidon de froment à 50 c. c. d'un autre empois contenant 3 0/0 d'un résidu qui représentait 9,8 0/0 du même amidon ; 2° mélange B, 1,5 d'amidon de froment ont été gélatinisés dans 100 c. c. d'eau; l'empois étant maintenu à 90°, j'y ai ajouté 1,5 de l'amidon résiduel qui se trouve ainsi gélatinisé non dans l'eau mais dans un empois à 1,5 0/0. J'ai saccharifié dans les mêmes conditions à 60°, les mélanges A et B, un empois à 3 0/0 fait avec l'amidon entier, et un empois à 3 0/0 fait avec l'amidon résiduel. Les quantités de sucre formées, rapportées à 100 de matière totale, ont été :

Pour l'empois fait avec l'amidon entier...........	76,2
Pour l'empois fait avec l'amidon résiduel..........	40,3
Pour le mélange A...............................	57,8
Pour le mélange B...............................	39,6

Des nombres précédents il ressort que dans le mélange A les deux empois se sont transformés sans exercer d'influence l'un sur l'autre; au contraire, dans le mélange B tout se passe comme si l'amidon résiduel était resté tout entier à l'état de dextrine ; d'autres expériences, faites dans les mêmes conditions, ont donné des résultats identiques, et établissent bien que les dextrines les plus difficiles à transformer en maltose, celles qui persistent le plus longtemps dans le liquide en voie de saccharification, proviennent des portions les plus cohérentes de l'amidon.

Comme contre-partie de ce que nous venons de voir, nous

devons trouver que les portions les plus facilement solubilisables de l'amidon sont aussi celles qui donnent le plus facilement du sucre.

I. 100 grammes d'amidon de froment ont été traités à 55° par 400 c. c. d'eau additionnés de 100 c. c. d'extrait de malt; au bout de 10 minutes, le mélange a été refroidi, filtré; le liquide filtré contenait dans 100 c. c. 6g,4 de matière dissoute; il a été remis au bain-marie à 60° où l'action de la diastase s'est poursuivie sur la matière amylacée entrée en solution ; quand l'action a été terminée, j'ai trouvé que la substance empruntée à l'amidon renfermait :

Maltose	96,2
Dextrine	3,8

L'empois fait avec l'amidon total et contenant environ 6 0/0 de matière solide traité dans les mêmes conditions par la diastase à 55° et à 60° a donné :

Maltose	70,2
Dextrine	29,8

II. Cette expérience a été faite de la même façon que la précédente; mais, avec de l'amidon de pomme de terre, elle a donné :

Substance dissoute au cours de la première digestion, rapportée à 100 d'amidon sec	20g,4
Substance dissoute dans 100 c. c. de liquide pendant la saccharification	4,6
Maltose p. 100 de substance dissoute, quand la saccharification est finie	98,2
Dextrine	1,8

Un empois à 4 0/0 de fécule saccharifié dans les mêmes conditions a donné :

Maltose	80,1
Dextrine	17,9

La conclusion qui se dégage de tout ce que nous avons appris au cours de ce chapitre est que le granule d'amidon qui constitue une masse hétérogène au point de vue physique, reste hétérogène après gélatinisation ; les portions les moins cohérentes donnent un empois qui se dextrinise et se saccharifie vite : les portions les plus cohérentes donnent un empois qui se dextrinise et se saccharifie lentement, elles fournissent les dextrines résiduelles qui restent non pas inattaquables, mais difficilement attaquables dans toute saccharification arrivée à son terme.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

13me ANNÉE SEPTEMBRE 1899 N° 9

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ORIGINE DES ANTICORPS TYPHIQUES

PAR

LE Dr LADISLAS DEUTSCH
De la Faculté médicale de Budapest.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

On commence à pénétrer le mécanisme de production des substances antagonistes chargées de contre-balancer l'influence nocive des microbes. Les récents travaux de M. Bordet, relatifs aux sérums antihématiques, ont montré que l'organisme agit de la même façon contre les substances inoffensives non bactériennes et contre les substances bactériennes nocives. Dans les deux cas, il y a formation d'anticorps, et en apparence par les mêmes règles.

Nous connaissons déjà un grand nombre de ces anticorps préparés par l'organisme. Aux antitoxines, aux anticorps préventifs, aux agglutinines, aux corps antipeptiques, nous ajouterons désormais les différentes substances antihématiques, les substances du lactosérum qui précipitent le lait, les antiprésures, les antitoxines du venin des serpents, du sérum d'anguille, de la ricine, de l'abrine, etc., c'est-à-dire une série de substances qui s'augmente indéfiniment.

La formation de tous ces corps semble suivre les mêmes règles, ou du moins présenter beaucoup d'analogies. Elle ne peut se faire en dehors de l'organisme : elle semble liée à la vie des cellules, auxquelles une certaine excitation semble nécessaire.

Quelles sont les cellules de l'organisme qui se chargent de cette besogne ? Voilà une question posée depuis longtemps.

On s'adressa d'abord aux antitoxines. MM. Wassermann et Takaki, en découvrant la faculté que possèdent les cellules du cerveau de fixer la toxine tétanique, ont cru avoir trouvé dans ces cellules mêmes l'endroit de formation des antitoxines solubles; cette opinion fut reconnue inexacte par MM. Metchnikoff et Marie. A l'heure actuelle, il n'y a pas un seul fait qui prouve que ce sont les cellules spécialement attaquées par la toxine qui produisent les antitoxines.

C'est incontestablement un grand mérite pour MM. Pfeiffer et Marx [1], d'avoir étudié le lieu de formation des anticorps cholériques qu'on trouve chez les jeunes lapins déjà 2-3 jours après une injection immunisante. Ces savants ont réussi à démontrer que ce sont les organes lymphoïdes, la moelle des os, les ganglions et principalement la rate, qui fabriquent les anticorps. Les agglutinines sembleraient suivre les mêmes règles que les corps préventifs.

Ces résultats ont été confirmés par M. A. Wassermann pour les anticorps Eberthiens [2], et ensuite par MM. Wassermann pour les corps antipneumococciques (moelle des os) ; quant aux agglutinines, ils sont confirmés par M. Van Emden [4] pour le bacille aérogène, niés tout récemment par Rath [5] pour le bacille d'Éberth.

Depuis le printemps 1898, nous avons travaillé, dans le laboratoire de M. Metchnikoff, à résoudre la dite question pour le bacille de la fièvre typhoïde ; que notre cher maître reçoive ici l'expression de notre plus vive reconnaissance pour l'intérêt avec lequel il a suivi notre travail dans toutes ses phases, et

1. *Zeitschrift für Hygiene*, tome 27, 1890. *Deutsche med. Wochenschrift*, 1898. N° 3.
2. A. WASSERMANN, *Berliner klin. Wochenschrift*, 1898, n° 10
3. M. WASSERMANN, *Deutsche med. Wochenschrift*, 1899, 9.
4. VAN EMDEN, *Zeitschrift f. Hygiene*, XXX, n° 1.
5. RATH, *Centralblatt für Barteriologie*, 1899, 15/16.

pour les multiples et précieux conseils qu'il a bien voulu nous donner.

PREMIÈRE PARTIE

RECHERCHES SUR L'ORIGINE DES CORPS PRÉVENTIFS ANTITYPHIQUES

Le plan de notre travail était de déterminer d'un côté le développement des anticorps dans le sérum, et d'évaluer d'autre part la valeur préventive des organes du même animal immunisé, pour trouver les organes qui sont en relation avec la formation des anticorps. Parallèlement à ces recherches, nous avons également suivi attentivement la formation des agglutinines, dont les relations prochaines avec les immunisines sont bien connues.

Les animaux d'expérience (cobayes) forment-ils des anticorps après une seule injection d'une culture typhique ? Voilà la première question à résoudre. Nous avons observé qu'une seule injection provoque parfaitement l'apparition des anticorps dans le sérum, à la condition d'être faite dans le péritoine, avec une culture entière sur gélose, chauffée pendant 1 heure à 66°.

Après avoir remarqué que la valeur préventive d'un sérum dépend en quelque mesure de la masse de culture injectée, nous avons injecté, à une série d'animaux, deux cultures (âgées de 24 heures) chauffées. Mais beaucoup d'animaux ne supportent guère cette masse bactérienne, et réagissent quelquefois en montrant les symptômes de l'intoxication typhique, un abaissement de température rapide et considérable, et un collapsus des plus accentués; d'autres cobayes ont succombé à une infection secondaire, due à d'autres espèces de microbes, qui ont envahi les animaux affaiblis par l'intoxication chronique.

Reprenant alors notre dose initiale d'une culture chauffée, nous nous en sommes servi pendant toutes nos recherches.

Expliquons d'abord la méthode de titrage des corps préventifs, et les circonstances — jusqu'ici peu décrites — dont l'observation rigoureuse est absolument indispensable. Nous nous sommes servi du procédé de M. Pfeiffer, qui, en appliquant la méthode de M. Ehrlich, nous a appris le premier à mesurer exactement la valeur immunisante d'un sérum anti-infectieux.

On ajoute des doses croissantes du sérum à un virus plusieurs fois sûrement mortel, on injecte les mélanges dans le péritoine des cobayes, qu'on observe ensuite attentivement. Les précautions, qui sont à prendre, se rapportent d'un côté au virus, d'autre côté aux animaux d'expérience.

Quant au virus, notre échantillon de bacilles d'Éberth, mis gracieusement à notre disposition par notre confrère, M. Cantacuzène, provenait de la rate d'un malade typhique; il ne montrait que des qualités de virulence assez faibles. Il nous fallait une douzaine de passages de cobaye à cobaye, dont quelques-uns à l'aide de sacs de collodion, pour exalter la virulence à un degré tel que le bacille soit apte à nos recherches. L'injection de 1/7 - 1/6 de culture sur gélose âgée de 24 heures, dans le péritoine de cobayes de 300 - 400 grammes, les tuait à coup sûr en 8-12 heures. Nous avons choisi comme virus de contrôle la dose d'un tiers de culture, c'est-à-dire la dose deux fois sûrement mortelle.

Injectée à un cobaye, cette dose ne provoquait presque aucune trace ni de leucocytose, ni de phagocytose: les animaux succombaient à la septicémie typhique expérimentale, à la généralisation des microbes, qui pouvaient être *toujours* retrouvés en nombre variable dans le sang. A l'autopsie, c'était toujours le tableau bien connu de la péritonite typhique : hyperémie de la paroi abdominale, des anses de l'intestin grêle, de l'estomac, des grands organes parenchymateux, des capsules surrénales; quelques gouttes de liquide péritonéal, d'aspect grisâtre ou rougeâtre, qui ne renfermait que des masses de bacilles bien mobiles ; pas de fibrine à la surface du foie et de l'estomac.

Le milieu d'émulsion est d'une grande importance. Nous avons observé que l'eau physiologique et le bouillon, loin d'être indifférents envers les microbes, exercent *in vitro*, pendant la première demi-heure de l'émulsion, une action « bactéricide » des plus énergiques sur le bacille d'Eberth ; en effet, dans une goutte suspendue, on trouve au bout de ce temps une grande partie des microbes immobilisés. Cette action de l'eau physiologique est très prononcée, et c'est pourquoi ce liquide n'est pas à choisir pour des recherches délicates. Quant au bouillon peptonisé neutre, il conserve mieux la mobilité des bacilles; mais au bout de quelque temps il présente une action bacté-

ricide passagère; aussi avons-nous toujours injecté l'émulsion aussitôt préparée.

La masse totale de l'injection est également de grande importance. L'injection d'une grande masse (8-10cc) de bouillon facilite énormément le développement de la péritonite microbienne. Nous avons observé qu'un tiers, même un quart de la dose minima, émulsionné dans 10 c. c. de bouillon, tue parfaitement les cobayes, quand la même dose, additionnée d'1-2 c.c., est inoffensive pour les témoins. L'explication de ce fait un peu bizarre, qu'un virus moins concentré agirait plus énergiquement, est assez facile : dans ces cas-là les microbes trouvent dans le péritoine inondé de bouillon des conditions de développement très favorables ; d'ailleurs le bouillon même, injecté à si grande dose, repousse nettement les phagocytes, et favorise ainsi l'infection. Eu égard à ces considérations, la masse totale de notre injection ne dépassait jamais 2-3 c. cubes.

Nous ajoutions notre sérum aussitôt après la préparation de l'émulsion, et nous l'injections de suite à des animaux de poids à peu près égal.

Les précautions décrites, quoique semblant peu importantes, sont d'une nécessité absolue pour le procédé de mensuration d'un sérum : en les observant rigoureusement, on n'a presque jamais de résultats irréguliers, comme c'est le cas quand on les néglige.

Après des injections du virus mélangé avec des doses différentes d'un sérum préventif, voici ce qu'on observe.

Virus et Sérum largement suffisant. — Après l'injection on observe l'agglutination des microbes, la phagolyse des cellules mononucléaires du péritoine, l'apparition de filaments fibrineux, qui finissent par précipiter les amas des microbes. Après 30, 50 minutes, on ne voit, dans le liquide retiré du péritoine à l'aide de pipettes Issaeff, que très peu d'éléments formés; une heure après l'inoculation commence l'apparition de phagocytes, qui englobent rapidement les rares microbes qui ont échappé à l'action agglutinante et précipitante du sérum. L'englobement de la plupart des microbes se fait dans la couche fibrineuse, qui, en enveloppant les bacilles, les fixe aux lames du péritoine. Si la dose de sérum était suffisante, les microbes ne réapparaissent plus après la première attaque des leucocytes. La température de l'animal,

qui s'est abaissée jusqu'à 36° (pas plus !) commence à remonter et dépasse bientôt la température normale.

16-20 heures après l'inoculation, le thermomètre monte à peu près à 40 degrés : quant au péritoine, on n'y trouve presque pas de microbes : il n'y a que des polynucléaires et un grand nombre de mononucléaires macrophages, qui remplissent la goutte retirée, d'apparence louche, crémeuse, blanchâtre. La plupart des polynucléaires sont vides, ils ne montrent que très rarement quelques microbes d'allure dégénérée ; les mononucléaires en contiennent encore quelques-uns d'aspect normal. Malgré cela, la disparition totale des microbes ne se fait que lentement : nous avons eu l'occasion de les mettre en évidence par des cultures sur gélose 2, même 3 jours après la guérison « microscopique » ; 24-38 heures après l'inoculation, la relation entre le nombre des polynucléaires et des mononucléaires macrophages correspond nettement à la dose du sérum employé : plus la guérison était rapide, plus il y a de macrophages.

Virus et Sérum insuffisant. — La différence réside dans le degré de l'activité phagocytaire, dans la réaction insuffisante de l'organisme. La goutte retirée du péritoine révèle, les premières heures déjà, le pronostic défavorable : en effet, malgré une phagocytose quelquefois des plus accentuées, nous voyons toujours la persistance des microbes libres, non englobés. Les animaux présentant après 4-6 heures beaucoup de microbes libres périront à coup sûr.

La mort, dans ces cas où le sérum retarde visiblement l'infection, ne survient qu'au bout de 20-30 heures, même plus tard : rappelons que les animaux de contrôle périssent en 8-12 heures. Le tableau de l'autopsie est le suivant : pas d'injection des intestins, des parois ; les organes, les capsules pâles, le foie et l'estomac enveloppés de fausses membranes dont l'épaisseur varie entre 1/2-2 millimètres. On trouve un épanchement péritonéal toujours abondant, de 3-10 c. c., tantôt visqueux, jaunâtre, tantôt plus liquide, mais troublé de flocons fibrineux. Ces flocons renferment toujours un nombre immense de phagocytes bourrés de bacilles. Nous remarquions assez fréquemment la présence de granulations bien colorables dans ces leucocytes — c'est alors un curieux spectacle de ne voir que des bacilles en dehors des cellules, et les cellules elles-mêmes

remplies de boules. Dans les cas où le sérum est largement suffisant, les bacilles disparaissent très vite de l'intérieur des cellules, sans subir de changement de forme : nous sommes d'accord avec l'opinion émise par MM. Metchnikoff, Bordet, Cantacuzène, et nous considérons ces granules de Pfeiffer comme des microbes encore vivants pour la plupart, qui en se contractant offrent aux influences nocives la surface la plus petite possible. Ces granules, nous les avons retrouvés toujours en grande quantité dans les couches de fibrine qui enveloppent le foie et l'estomac, où ils prennent place dans des phagocytes d'aspect modifié. En les colorant avec une vieille solution de bleu de méthylène, les noyaux prennent une couleur violet pâle, et présentent des prolongements dilacérés, criblés de petites impressions, dont le centre est occupé par une ou plusieurs granulations.

Dans ces cas les microbes restent localisés au péritoine ; dans le sang on ne les met que rarement en évidence.

On peut observer tous les états transitoires depuis cette mort retardée, jusqu'à la guérison parfaite. Ainsi nous avons eu des cas où, 24-32 heures après l'inoculation, l'animal ne paraissait nullement malade : l'exsudat péritonéal ne renfermait que des macrophages, et les phagocytes ne se révélaient que par leurs noyaux, qui se présentaient sous la forme de pointes bleu verdâtre dans l'intérieur des mononucléaires. C'est avec la plus grande peine que nous découvrions quelques rares bacilles dans les préparations colorées, la culture n'en donnait pas plus d'une dizaine de colonies — et malgré cela, un ou deux jours après, les microbes réapparaissaient dans l'exsudat. Or les préparations démontrent que, dans ces cas, c'est une nouvelle génération de microbes qui pousse dans les cellules mononucléaires, douées de propriétés microbicides peu énergiques, et qui, après leur destruction, ne manque pas de tuer l'animal.

Dans d'autres cas la maladie, due à cette nouvelle poussée, ne fut mortelle qu'au bout de 5-6 jours : les animaux ont alors succombé à une péritonite chronique, qui se manifestait par une sorte de cachexie des plus accentuées. Au cours de cette intoxication chronique, le nombre des bacilles dans l'exsudat péritonéal reste toujours restreint, il n'y a pas lieu à une généralisation des bacilles d'Eberth : au contraire, le sang renferme le plus fréquemment d'autres espèces, qui ont envahi l'animal.

Cette série de faits montre les difficultés qui surgissent quelquefois dans le titrage d'un sérum de valeur peu prononcée. En effet, la détermination de la valeur immunisante n'est pas une opération semblable aux expériences chimiques, au cours desquelles nous déterminons par une réaction nette la quantité d'un corps dans un composé chimique. C'est un ensemble de signes peu précis qu'il faut interpréter dans nos expériences. Quelquefois même, les limites étaient si indécises, qu'il nous a fallu 2-3 fois répéter la série des inoculations, pour arriver à un résultat certain.

Dans nos expériences, *nous avons pris pour titre préventif la quantité minima d'un sérum, qui, additionnée à la dose du virus deux fois sûrement mortelle, la rend inoffensive pour l'animal.* Dans des rares cas, nous avons accepté comme étant de valeur immunisante la dose d'un sérum qui, tout en faisant disparaître les microbes, n'a pas empêché l'intoxication chronique de l'animal.

I. *Développement du pouvoir préventif du sérum.*

Parlons d'abord du pouvoir préventif (anti-infectieux) du sérum des cobayes neufs. Parmi une dizaine d'animaux, nous n'en avons rencontré qu'un dont le sérum était actif contre le virus 3 fois mortel à la dose d'un c. c.; deux, dont le titre préventif était de 2 c. c.; la dose préventive des autres animaux surpassait 3-5 c. c.

Pour le virus 2 fois mortel (1/3 de culture), la valeur antityphique variait entre 1-2 c. c. Retenons ce chiffre comme point de départ de nos recherches.

Un jour après l'inoculation, le sérum ne montre pas de propriétés préventives : dans le cas examiné, il possédait le titre de 2 c. c.

2e *jour*. Valeur normale : 1 c. c.

3e *jour*. Deux cobayes. Le sérum du premier était nettement préventif à 1 c. c.; le sérum de l'autre était plutôt favorisant : les animaux qui le recevaient ont succombé avant le témoin.

4e *jour*. 4 cobayes. La valeur préventive ne surpasse pas chez l'un d'eux la valeur normale (1 c. c.); deux animaux, au

contraire, possèdent comme titre préventif : 0,50 c. c.; l'un même : 0,30 c. c. C'est donc au quatrième jour que nous constations l'augmentation des corps préventifs dans le sérum.

6e *jour*. 4 animaux. La valeur antityphique a monté dans tous les cas examinés. Nous notons les titres suivants : 0,30, 0,20, 0,10, 0,10 c. c.

7e *jour*. 2 animaux de titre pareil : 0,20 et 0,10 c. c.

10e, 12e, 13e *jour*. 3 animaux de la même valeur : 0,05 c. c. C'est *le maximum du pouvoir préventif* provoqué par une seule injection.

14e *jour*. 2 animaux. Valeur : 0,10; 0,10 c. c. Commencement de la décroissance.

20e *jour*. Un animal : 0,20 c. c. ne préserve plus.

22e *jour* : 0,10 c. c.; 27e jour : 0,15 c. c.

Le schéma de la valeur préventive pourrait se traduire par une courbe, dont l'ascension commence le 4e jour (0,50), devient plus prononcée et plus rapide le 6e jour (0,15-0,10), atteint le maximum (0,10-0.05) le 10-12e jour, pour rester quelques jours à cette hauteur, puis pour descendre lentement. Le développement de la plus grande partie des anticorps se fait vers le 6e jour.

Ce schéma résume 22 cas bien observés; quelquefois pourtant, le développement de la valeur antityphique n'est pas en accord avec la courbe donnée. Nous avons séparé trois cas. Dans le premier, il s'agit d'un animal dont le sérum, 5 jours après l'injection, nous présentait déjà une valeur de 0,05 c. c.; les sérums de deux autres animaux, quoique examinés le 10e et le 11e jour, nous ont donné comme titre préventif le chiffre de 0,20 et 0,50 c. c. Retenons qu'il y a, dans la formation des anticorps, un individualisme qu'il est bon de se rappeler.

Nous avons également rayé de notre tableau le titre de 3 animaux, lesquels ont été inoculés avec un virus 3 fois mortel (2/5-1/2 culture). Nous avons pu très bien observer la grande influence de la quantité du virus sur le titre préventif : en effet, le 6e jour, au lieu de 0,20-0,10 c. c., nous notons 0.80 c. c.; le 9e et le 10e jour, au lieu de 0.10-0,05 c. c., nous avons évalué le titre de 0.30 et 0,20 c. c. Une légère augmentation du virus nous donne un abaissement considérable du titre.

Ces chiffres se rapportent à des injections immunisantes

intrapéritonéales; quant aux injections sous-cutanées de cultures typhiques, nous les avons abandonnées complètement. En effet, la culture injectée provoque toujours une nécrose considérable de la peau, à la suite de laquelle nos animaux ont succombé. Après quelques essais, nous avons pourtant réussi à éviter les nécroses de la peau en injectant notre culture divisée en plusieurs endroits du corps. Mais alors les corps préventifs ne se formaient que très faiblement. Par exemple, l'un de nos animaux ne présentait le 4e jour dans son sérum aucun pouvoir préventif; un deuxième (le 6e jour) n'a pas surpassé la valeur d'un c. c.; le troisième (le 7e jour) a donné la valeur de 0,30 c. c.

II. *Valeur préventive des organes.*

Pour mettre en évidence les anticorps des organes, on se sert d'une méthode que nous employons chaque jour pour faire apparaître les diastases des cellules en général, celle de l'extraction de la cellule mécaniquement détruite.

Après avoir fait saigner à blanc les animaux, nous leur enlevons aussi vite que possible les organes à examiner, nous les pesons exactement, puis nous les broyons bien dans un mortier, tantôt tout simplement, tantôt à l'aide de sable quartzeux stérilisé. Ceci fait, quand le jus ainsi obtenu ne présente sous le microscope que quelques noyaux, qui résistent plus longtemps, nous y ajoutons du bouillon stérile. Nous mettons l'extrait ainsi préparé dans la glacière pendant 24 heures : au bout de ce temps, les débris cellulaires gagnent le fond et l'extrait s'éclaircit. On opère avec ces extraits comme avec le sérum. Pour comparer le suc d'organes au sérum, nous les injectons toujours en même temps, sans oublier un témoin, qui reçoit le virus non additionné de suc d'organes ou de sérum.

Parmi les organes examinés, nous citons : le foie, les capsules surrénales, le tissu de l'épiploon, la rate, la moelle des os, l'exsudat péritonéal. Disons d'abord que les organes des animaux normaux, même à une dose de 1 gr., ne manifestent aucun pouvoir préventif ni agglutinatif vis-à-vis du bacille typhique.

1. Les résultats relatifs *au foie, à l'épiploon*, aux *capsules surrénales* ont été nettement négatifs. Dans aucun cas, le pouvoir antityphique de ces organes ne surpassait celui du sérum : dans la plupart des cas, ce n'est qu'avec la plus grande peine que nous avons réussi à y découvrir des traces des anticorps.

2. Quant à l'*exsudat péritonéal*, au début de nos recherches, nous pensions que les anticorps se formaient dans les cellules mononucléaires macrophages de l'exsudat, qui englobent une grande partie des polynucléaires remplis des bacilles injectés, et que M. Gruber considérait déjà comme les fournisseurs des anticorps. Le tableau suivant nous renseigne sur cette hypothèse.

TABLEAU COMPARATIF DES VALEURS PRÉVENTIVES DU SÉRUM ET DE L'EXSUDAT

	Nos.	Marque de l'animal.	Jour.	Sérum.	Exsudat.	Notes.
	1	II	2	1,00	($>$ 0,10)*	
	2	45	3	($>$ 2,00)	($>$ 0,20)	
	3	III	4	0,50	($>$ 0,04)	
	4	39	4	0,30	($>$ 0,30)	
	5	77	6	0,30	($>$ 0,30)	
	6	190	6	0,10	0,30	
	7	190/2	6	0,10	($>$ 0,20)	Exs $> \frac{Ser}{2}$
	8	35	7	0,20	0,75	
	9	27	7	0,10	($<$ 0,20)	
	10	21	10	0,05	($>$ 0,30)	
	11	66	12	0,05	($>$ 0,05)	
	12	31	13	0,05	0,20	
	13	32	14	0,10	0,10	Exs = Ser
	14	34	14	0,10	($>$ 0,03)	
	15	11	22	0,10	0,10	Exs = Ser
	16	11/*a*	27	0,15	($>$ 0,30)	
Cas irréguliers.	17	3	5	0,05	0,10	Exs $= \frac{Ser}{2}$
Cas irréguliers.	18	27/*a*	10	0,20	($>$ 0,10)	
Cas irréguliers.	19	8/30	11	0,50	($>$ 0,30)	
Virus fois mortel.	20	2	6	0,80	($>$ 0,05)	
Virus fois mortel.	21	75	9	0,20	($>$ 0,70)	
Virus fois mortel.	22	83	11	0,30	($>$ 0,30)	
	23	A	7	0,30	($>$ 0,10)	Injection sous-cutanée.

* $>$ (0,10) signifie que 0,10 c. c. ne préservait nullement (nous n'avions plus d'exsudat à notre disposition).

Dans 23 cas, nous avons comparé l'exsudat avec le sérum. Dans 4 cas, la quantité totale de l'exsudat, qui était à notre disposition, fut trop petite pour en tirer des conclusions (nos 1, 2, 3, 20); dans 19 cas, l'exsudat était de valeur beaucoup inférieure à celle du sérum; enfin, dans 4 cas, l'exsudat renfermait presque autant d'anticorps que le sérum (nos 7, 13, 15, 17.)

Résultat : *négatif. Les anticorps ne se forment pas au niveau de l'injection faite.*

TABLEAU COMPARATIF DES VALEURS PRÉVENTIVES DU SÉRUM ET DE LA MOELLE DES OS

	Nos.	Marque de l'animal.	Jour.	Sérum.	Moelle.	Notes.
	1	56	3	1,00	(> 0,25)	
	2	45	3	(> 2,00)	(> 0,15)	
	3	39	4	0,30	(> 0,30)	
	4	II *a*	6	0,20	(< 0,10)	M > S
	5	77	6	0,30	(> 0,15)	
	6	190/2	6	0,10	(> 0,15)	
	7	35	7	0,20	(> 0,20)	
	8	27	7	0,10	(> 0,20)	
	9	21	10	0,05	(> 0,10)	
	10	66	12	0,05	0,10	$M = \frac{S}{2}$
	11	31	13	0,05	(> 0,20)	
	12	32	14	0,10	(> 0,20)	
	13	34	14	0,10	(> 0,15)	
	14	11	22	0,10	0,10	M = S
	15	11/*a*	27	0,15	(> 0,10)	
Cas irréguliers.	16	3	5	0,05	(> 0,10)	
Cas irréguliers.	17	27 *a*	10	0,20	0,20	M = S
Cas irréguliers.	18	78/30	11	0,50	(> 0,20)*	M = S
Virus fois mortel.	19	2	6	0,80	(> 0,20)	
Virus fois mortel.	20	95	9	0,20	(> 0,20)	
Virus fois mortel.	21	83	11	0,30	(> 0,25)	
	22	A	7	0,30	(> 0,10)	Injection sous-cutanée.

* Survie de plusieurs jours. La moelle peut être considérée comme équivalente au sérum.

Nos recherches comparatives se rapportent à 22 cas examinés. Dans 5 cas (1, 2, 11, 19, 22), la quantité de la moelle était trop petite pour permettre une détermination exacte de la valeur préventive: dans 12 cas, la moelle agit sûrement plus faiblement que le sérum. Dans un cas (10), la moelle renfermait la

moitié des anticorps du sérum; dans 3 cas (14, 17, 18), moelle et sérum étaient également actifs; enfin, nous avons un animal (4) dont la moelle était plus efficace.

Il s'agit d'un cobaye au 6e jour de son immunisation, c'est-à-dire, justement au temps de la formation des anticorps. Le titre du sérum était de 0,20, tandis que 0,10 de la moelle était déjà actif; *la moelle semble donc être un des organes dans lesquels les anticorps typhiques se forment*. Mais ce n'est pas démontré pour tous les cas.

La rate. — Remarquons d'abord que c'est à la rate que MM. Pfeiffer et Marx ont attribué le rôle le plus important dans la formation des corps anticholériques. Notre attention une fois éveillée, c'est avec le plus grand soin que nous avons essayé d'étudier le rôle de cet organe au cours de l'immunisation.

Le tableau suivant contient les titres comparatifs de 30 cas.

TABLEAU COMPARATIF DES VALEURS PRÉVENTIVES DU SÉRUM ET DE LA RATE

	Nos.	Marque de l'animal.	Jour	Sérum.	Rate.	Notes.
	1	I	1	2,00	(> 0,50)	
	2	II	2	1,00	(> 1,00)	
	3	50	3	1,00	(> 0,50)	
	4	45	3	(> 2,00)	(> 0,50)	
	5	I *a*	4	1,00	(> 0,65)	
	6	III	4	0,50	(> 0,30)	
	7	F	4	0,50	(> 0,50)	
	8	39	4	0,30	0,30	R = S
	9	II *a*	6	0,20	0,10	R > S
	10	77	6	0,30	0,15	R > S
	11	190	6	0,10	0,10	R = S
	12	190/2	6	0,10	0,05	R > S
	13	35	7	0,20	(> 0,30)	
	14	27	7	0,10	(> 0,20)	
	15	21	10	0,05	0,20	
	16	66	12	0,05	0,15	
	17	31	13	0,05	0,05	R = S
	18	32	14	0,10	(> 0,20)	
	19	34	14	0,10	0,10	R = S
	20	11	22	0,10	(> 0,20	
	21	11/*a*	27	0,15	0,10	R > S
	22	3	5	0,05	(> 0,30	
Cas irréguliers.	23	27 *a*	9	0,20	0,30	$R = \frac{2}{3} S$
	24	78/30	11	0,50	(> 0,10)	

Virus 3 fois mortel.	25	2	6	0,80	(> 0,30)	
	26	75	9	0,20	(> 0,40)	
	27	83	11	0,30	(> 0,20)	
Injections sous-cutanées.	28	B	4	(< 0,50)	(> 0,50)	
	29	G	6	0,80	(> 0,80)	
	30	A	7	0,30	0,30	R = S

Examinons ces 30 cas. Nous en rayerons d'abord 9 cas, où la comparaison n'était pas possible (1, 3, 4, 5, 6, 24, 25, 27, 28) à cause de la quantité insuffisante de l'organe qui était à notre disposition. Il reste 21 *cas;* chez 11 animaux la rate renfermait moins d'anticorps que le sérum. Au contraire, la rate était dans 6 cas de même valeur que le sérum (8, 11, 17, 19. 23, 30), dans 4 cas (9, 10, 12, 21), elle était plus efficace.

De ces 10 *cas où la rate était plus préventive que le sang,* 7 se rattachent à la période de formation (4-9e jour), les 3 autres sont de la période ultérieure (13, 14, 17e jour). Résultat : *Nous avons réussi à reconnaître dans la rate un deuxième foyer des anticorps typhiques,* qui s'y trouvent dans la moitié des cas en plus grande quantité que dans le sang.

Pour envisager le rôle de la rate, nous avons essayé d'immuniser des animaux splénectomisés.

Rappelons que les cobayes supportent bien la splénectomie. L'opération faite aseptiquement, il n'y a qu'un danger à craindre. c'est la perte du sang, à laquelle on obvie facilement par la ligature du hile de la rate. Pourtant, au début de nos expériences, nous avons perdu un grand nombre d'animaux le 7-9e jour après l'opération. C'était toujours une péritonite due à un petit bacille coliforme, extrêmement virulent pour le cobaye ; nous croyons que l'origine de cette péritonite est à chercher dans un peu de tissu de la rate resté en place, qui renfermait peut-être des bacilles de provenance intestinale, englobés bien entendu, et qui après la mort des phagocytes envahissaient l'organisme. Quoi qu'il en soit, les plus petites traces de la rate une fois enlevées, les animaux n'ont plus succombé.

Nous observions pendant plusieurs semaines les cobayes dératés, et quand ils avaient regagné leur poids initial, nous leur injections notre dose d'une culture chauffée, pour les immuniser. Mais les premiers essais nous ont convaincu que cette méthode d'immunisation n'aboutit pas. Une intoxication des plus aiguës intervient toujours, et les animaux succombent à un collapsus

foudroyant, à une chute brusque de température. Nous avons observé au cours des trois premières heures un abaissement de température de 7°, dans un deuxième cas de 9°, etc., etc. Quelquefois l'injection d'une culture entière ne tuait pas les animaux par intoxication, mais par une infection secondaire : nous avons trouvé alors les bords de la suture congestionnés, livides, et infectés par des streptocoques, qui, étant enkystés dans des vieux petits abcès, ont évidemment regagné leur virulence au cours de l'intoxication. Les animaux dératés étaient très sensibles envers le poison des bacilles typhiques chauffés, mais nous avons vu qu'il s'agit dans ces cas tout simplement d'un affaiblissement de résistance consécutif à l'opération. Après quelques tâtonnements, nous avons réussi parfaitement à immuniser nos animaux dératés, en leur injectant notre dose immunisante divisée en deux parties égales dans l'espace de 24 heures. La dose d'une demi-culture chauffée ne provoquait pas d'intoxication.

Nous disposons de 5 cas pareils. En considération du fait que le maximum du pouvoir antityphique apparaît vers le 8-11e jour, nous avons recherché si, dans cette période, il y a une diminution du pouvoir préventif chez les dératés.

Le tableau suivant donne les valeurs préventives du sérum et de la moelle des os.

TABLEAU DES ANIMAUX DÉRATÉS

Nos.	Marque.	Dératé depuis.	DOSE de culture reçue.	Immunisé depuis.	Titre du sérum.	Titre de la moelle	NOTES
1	D 21	26 jours.	19/IV 1/2 cult. 20/IV 1/2 cult.	8 jours.	0,30	0,30	
2	D 1	27 jours.	27/III 1/2 cult. 28/III 1/2 cult.	8 jours.	0,20	$>$ 0,20 *	* Une survie de plusieurs jours. Titre limite.
3	D 28	24 jours.	25/IV 1/2 cult. 26/IV 1/2 cult.	10 jours.	0,10	0,25	
4	D 7	22 jours.	25/III 1/2 cult. 26/III 1/2 cult.	11 jours.	0,10	($>$ 0,30)	
5	D 24	26 jours.	19/IV 1/2 cult. 20/IV 1/2 cult.	12 jours.	0,05	0,05	

Les valeurs préventives du sérum correspondent absolument à celles des non dératés. Quant aux organes, dans deux cas le titre de la moelle était supérieur à celui du sang (1-5), dans un cas les deux valeurs étaient presque égales (2), dans deux cas la moelle était moins préventive (3-4).

Le résultat de ces expériences n'était pas douteux : *Le développement du pouvoir antityphique du sérum se fait chez les animaux dératés aussi bien que chez les non dératés.*

Les résultats de la splénectomie ont élucidé en partie le problème : d'autre part ils nous ont posé des nouvelles questions. Les anticorps se forment évidemment dans plusieurs organes. Concluons que ce sont surtout la rate et la moelle qui prêtent leur concours à l'organisme pour la fabrication des anticorps typhiques, c'est-à-dire les mêmes organes auxquels MM. Pfeiffer et Marx attribuent un grand rôle dans la fabrication des anticorps cholériques. Ces organes se suppléent : si nous enlevons la rate, le développement des anticorps se fait par les autres organes.

Comment ces organes forment-ils les anticorps? La spécificité des anticorps nous indique évidemment que ce sont certaines parties du protoplasme microbien qui excitent les cellules vivantes de l'organisme à la production des anticorps. Or, la question qui se pose est celle-ci : les produits microbiens qui donnent l'impulsion à l'activité formatrice cellulaire se trouvent-ils fixés aux organes qui les transforment, ou bien sont-ils dissous dans les humeurs, et ne se transforment-ils qu'en se rencontrant dans la circulation avec lés mêmes cellules ?

Pour résoudre cette importante question, nous nous adressons également à la splénectomie. En effet, si les produits intermédiaires entre les produits bactériens et les anticorps, ces substances hypothétiques que nous désignerons comme « substances immunogènes ou antigènes », se trouvent fixés dans la rate, en enlevant cet organe formateur vers le 4-5e jour après l'immunisation, c'est-à-dire avant l'apparition des anticorps, nous changerons sensiblement le cours de l'immunisation.

Nous possédons 6 cas pareils dont l'examen nous donne le tableau suivant :

TABLEAU DES ANIMAUX IMMUNISÉS PUIS DÉRATÉS

Nos	Marque.	Immunisé.	Dératé après	Examen après	Titre du sérum.	Titre de la moelle.	NOTES
1	A 20	29/III	3 jours.	7 jours.	0,50	0,50	
2	A 26	3/IV	3 jours.	8 jours.	0,30	0,25	
3	A 23	31/III	3 jours.	13 jours.	0,10	0,20	
4	A 24	1/IV	5 jours.	10 jours.	0,50	(> 0,40) **	Péritonite.
5	A 14	27/III	5 jours.	11 jours.	0,20	0,20	
6	A 32	22/IV	5 jours.	11 jours.	0,50 *	(> 0,40) **	* 0,30 était sans aucun effet.

** Titre indéterminable; toute la quantité de la moelle dont nous disposions était inefficace.

Chez les animaux dératés le 3e jour de l'immunisation, il y a déjà une diminution assez sensible (nos 1-2) ; chez les animaux *dératés le 5e jour, cette diminution est très forte.* Les deux cas 4 et 6 ne renferment, quoique immunisés depuis le 10e et le 11e jour, que très peu d'anticorps ; la diminution chez l'animal no 5 n'est pas si sensible.

En somme *la splénectomie, faite 3-5 jours après l'injection immunisante, occasionne, dans une partie des cas, une dépression considérable du pouvoir préventif* ; ce qui prouve que *le cinquième jour une partie des produits « immunogènes » est déjà fixée dans la rate.*

Nous remarquons que dans trois cas (2, 3, 5), l'abaissement n'est pas évident : or, la valeur de la rate en substances immunogènes doit être assez variable. Quels organes prennent part dans ces cas à la formation des anticorps ? Dans trois cas la moelle renfermait moins d'anticorps. (On voit qu'au moins un tiers des cas reste toujours sans explication).

Le rôle fixateur de la rate étant reconnu, nous nous sommes demandé s'il n'était pas possible de mettre directement en évidence les substances antigènes fixées. La question peut être ainsi posée : Quel est le sort des produits microbiens injectés ?

Le sort des microbes morts injectés n'est pas à élucider à l'aide du microscope. Comme nous l'avons déjà exposé, 48 heures après l'injection des microbes *vivants*[1], les phagocytes, qui ont englobé les microbes, sont eux-mêmes englobés et détruits par les macrophages mononucléaires, de sorte que le troisième jour il n'y a que des traces des polynucléaires. *A fortiori* nous affirmons que les produits renfermant les corps microbiens digérés et dissous prennent place également dans les macrophages. Ces cellules disparaissent de la surface du péritoine vers le quatrième jour, et c'est justement le quatrième, cinquième jour qui marque la première apparition des anticorps typhiques chez le cobaye. Nous supposions que ces macrophages, chargés de produits microbiens, finissaient par arriver dans les organes lymphoïdes, dont nous avons appris à connaître les relations avec les anticorps. Il n'y a pas de moyen de reconnaître ces mononucléaires dans la rate, puisqu'ils sont absolument semblables aux cellules endothéliales spléniques fixes. Mais nous avons imaginé un procédé qui les met bien en évidence. En effet, en injectant du suc d'un organe chargé de produits typhiques à un deuxième animal, le sérum de celui-ci acquerra au bout de 8-10 jours des propriétés agglutinantes envers le bacille d'Eberth. Nous nous sommes servi de cette méthode de l'agglutination « diagnostique » pour étudier la question.

Dans 7 cas, nous avons injecté dans la cavité péritonéale des cobayes des rates extirpées entre le 3e et le 5e jour après l'injection immunisante. Dans notre première expérience, une péritonite foudroyante, avec un petit para-colibacille dont nous avons parlé, a tué l'animal en quelques heures. Désormais, pour éviter cet accident, nous provoquons par des injections de bouillon une forte hyperleulocytose péritonéale, qui conférait aux animaux une résistance considérable à l'égard des microbes introduits avec la rate broyée. Remarquons que le sérum des cobayes choisis ne présentait qu'un pouvoir agglutinant faible : sa valeur ne surpassait pas la dilution de 1 : 5.

Il nous reste 6 cas observés. Au bout de 7 jours le sérum de 3 des cobayes — injectés avec des rates du cinquième jour —

1. Les microbes vivants sont plus aptes à cette sorte de recherche que les microbes chauffés qui, ayant perdu leur colorabilité, sont difficiles à retrouver dans les phagocytes.

agglutinait sensiblement : ce pouvoir agglutinant dans deux cas ne surpassait pas le 1/20, une fois il était de 1/30. Dans trois cas, les rates n'ont pas provoqué l'agglutination dans le sérum. Le suc des rates extirpées n'agglutinait, bien entendu, jamais que très faiblement (1 : 3) le bacille typhique.

Par la méthode de l'agglutination diagnostique, nous avons réussi à démontrer directement la présence de substances typhiques dans les rates des animaux immunisés ; ainsi ces expériences peuvent être considérées comme la contre-épreuve des expériences relatives à l'influence de la splénectomie tardive sur le cours de l'immunisation.

Malgré ces données, les résultats n'étaient pas encore suffisamment clairs. En effet, dans la moitié des cas, l'injection des rates restait sans effet ; d'autre part, le degré faible de l'agglutination, dans les trois cas où elle se produisait, nous a démontré que la rate ne peut être considérée comme un filtre absolu, qui retiendrait toutes les cellules chargées de produits microbiens. Une grande partie des produits antigènes doit se trouver ailleurs. Cela nous a conduit à entreprendre de nouvelles recherches.

Dans ce but nous nous sommes adressé à un cobaye immunisé depuis quatre jours ; l'animal en question fut saigné à blanc, puis nous lui avons extirpé le foie et la rate. D'un lot de quatre animaux neufs, le premier a reçu dans le péritoine l'extrait de trois grammes de foie, le deuxième la rate entière broyée, le troisième tout le sérum, 12 c. c., le quatrième, 10 c. c. d'un sérum préventif et agglutinant jusqu'à la dilution de 1 : 300. Ce quatrième animal nous a servi comme témoin. Huit jours après, les valeurs agglutinantes de ces animaux se présentèrent ainsi :

Organes du 4e jour.	I. Animal « Foie »	1 : 5	Agglutination normale.	
	II. Animal « Rate »	1 : 20	Légère élévation.	Agglut. active.
	III. Animal « Sérum non aggl. ».	1 : 300	Brusque élévation.	
Témoin.	IV. Animal « Sérum aggl. »....	1 : 30	Descente.	Agglut. passive.

Au bout de 8 jours, les agglutinines injectées avec le sérum préventif témoin ont en grande partie quitté l'animal IV : au contraire le sérum *non* agglutinant provoquait chez le deuxième animal III la formation d'agglutinines de haute valeur. Dans ce

cas c'était une *immunité active produite par un sérum non préventif, mais par contre chargé de produits microbiens.*

Cette expérience nous démontre nettement qu'en effet une grande partie de la culture injectée passe dès les premiers jours dans le sang.

Nous avons renouvelé cette expérience dans *cinq cas*. Deux fois nous avons eu, à l'aide de 10 c. c. de sérums du 3e jour, des valeurs agglutinantes de 1 : 40, et 1 : 50; une fois la valeur de 1 : 20; dans deux cas, par contre, l'injection de 5 c. c. de sérum du 2e jour ne provoqua pas l'agglutination secondaire.

Ces deux cas peuvent-ils anéantir nos résultats antérieurs? Non. Nous avons déjà observé dans le laboratoire de M. Gruber que la valeur agglutinante d'un sérum n'observe pas un strict parallélisme avec la masse de la culture injectée. Au contraire, en injectant des quantités inférieures à 1/6-1/10 de culture chauffée, l'injection ne provoque plus la formation des agglutinines. De même les 2 cas mentionnés ne prouvent pas l'absence des produits dans les rates injectées; peut être les organes en question en renfermaient-ils des quantités trop faibles pour donner naissance à des agglutinines en quantité appréciable.

Néanmoins la présence des produits typhiques dans le sang est indubitable. Cela concorde d'ailleurs avec des faits analogues déjà signalés. En effet, au début de l'immunisation antidiphtérique, on retrouve les toxines injectées dans le sang des animaux, et d'après une communication orale de M. Batzaroff, on observe également, au début de l'immunisation antipesteuse, que la toxine pesteuse existe pendant quelques jours dans le sérum des cobayes immunisés. Quand il s'agit, — comme dans ces cas — de toxines assez puissantes, on les met facilement en évidence en injectant le sérum à des petits animaux sensibles auxdites toxines : pour les produits typhiques peu toxiques, la démonstration ne fut possible que par la méthode décrite d'agglutination diagnostique.

En somme, tous les phénomènes se rapportant à la formation des anticorps sont caractérisés par une variabilité considérable. La valeur préventive des organes nous indique certainement que, dans une grande partie des cas, les corps préventifs se forment dans la rate et dans la moelle, mais elle ne nous indique pas quelles sont les cellules qui les fabriquent.

La question n'est pas résolue. Cependant, si l'on tient compte que : 1° dans une moitié des cas c'est le sang qui renferme le plus d'anticorps ; 2° la splénectomie tardive est dans la moitié des cas sans influence sur la valeur préventive du sérum ; 3° assez souvent la rate ne contient que peu de substances antigènes ; 4° enfin ces dernières se trouvent assez fréquemment dans le sang même, de toute cette variabilité des phénomènes nous pouvons conclure qu'*il n'y a pas pas d'organe formateur, il n'y a que des endroits de formation*. Ces endroits n'ont qu'un signe caractéristique de commun, c'est leur teneur en leucocytes. En effet, en supposant avec M. Metchnikoff que ce sont les cellules leucocytaires — nous pensons : les mononucléaires — qui, chargées de produits typhiques, quittent le point d'infection pour se rendre soit dans le sang, soit dans la rate, soit dans les autres organes lymphoïdes, pour fabriquer les anticorps dans les organes où on les trouve en plus grande quantité, nous comprendrons tous les faits précités. En broyant la rate et la moelle, nous n'avons fait qu'extraire les anticorps des nombreux mononucléaires que ces organes renferment ; en injectant cet organe trituré, nous injectons en réalité ses leucocytes ; enfin, en enlevant la rate d'un animal au début de son immunisation, nous le privons d'une grande quantité de mononucléaires chargés de produits antigènes.

Jusqu'à preuve du contraire, il nous semble que cette hypothèse est la seule plausible. Dès lors, voici nos conclusions :

1.) Une seule injection intrapéritonéale d'une culture typhique provoque la formation des anticorps chez les cobayes ;

2.) Le pouvoir antityphique apparaît dans le sérum vers le 4e-5e jour, va en augmentant pour atteindre son maximum vers le 11e-12e jour (0,05 c. c. préservant contre un virus deux fois mortel). Il diminue alors, mais il peut être mis en évidence encore un mois après l'injection ;

3.) Le pouvoir antityphique est peu considérable dans le foie, le rein, les capsules surrénales, l'épiploon. La valeur du pouvoir antityphique de l'exsudat péritonéal se rapproche quelquefois de celle du sérum, sans la surpasser jamais ;

4.) Dans 1/4-1/5 des cas, la moelle des os, et, dans la moitié des cas, la rate sont plus actives que le sérum ;

5.) Les organes lymphoïdes sont en relation avec la formation des anticorps ; mais assez souvent (1/3 des cas) ils ne pren-

nent nullement part à la formation des corps préventifs. Nous supposons qu'alors ces corps se forment ailleurs, peut-être dans le sang même;

6.) Le rôle des dits organes se démontre par les faits suivants :

α) Le développement du pouvoir antityphique chez les animaux dératés longtemps avant l'immunisation se fait tout comme chez les animaux neufs; dans la majorité de ces cas, la moelle des os est plus efficace que le sérum ;

β) La splénectomie des animaux durant les premiers jours de leur immunisation est suivie par une diminution considérable du pouvoir antityphique; quelquefois cet effet de la splénectomie tardive n'est pas prononcé ;

γ) L'injection des rates ainsi extirpées dans le péritoine d'autres cobayes provoque l'apparition des agglutinines spécifiques dans le sang de ceux-ci, ce qui prouve que des substances typhiques « antigènes » se trouvent fixées dans la rate ;

δ) Une autre partie — variable — de l'injection immunisante, peut être également mise en évidence par la même méthode d'agglutination diagnostique dans le sang même des animaux récemment immunisés ;

7.) Nos expériences ne montrent pas quelles sont les cellules formatrices : elles ne désignent que les endroits de formation des anticorps. Vu d'un côté le caractère lymphatique de ces endroits, (sang, rate, moelle), d'autre côté la grande variabilité des faits observés. nous supposons que ce sont des cellules migratrices d'origine leucocytaire qui, chargées de produits microbiens, y forment les anticorps préventifs.

II. PARTIE.

RECHERCHES SUR L'ORIGINE DES AGGLUTININES ET LEURS RELATIONS AVEC LES ANTICORPS

1.) *Relations entre le pouvoir préventif et agglutinant.*

Parallèlement aux recherches relatives aux corps préventifs, nous avons déterminé le pouvoir agglutinant des sérums et des

organes. D'abord nous avons voulu déterminer, par un grand nombre de dosages exacts, les relations entre le pouvoir anti-infectieux et le pouvoir agglutinant d'un sérum.

Cette question n'est pas encore résolue, puisque actuellement nous ne pouvons isoler ni les anticorps, ni les agglutinines de leur mélange : toutes les tentatives de séparation des deux corps soit par le chauffage, soit par des agents chimiques, ont échoué.

Le sérum d'un malade typhique, le sérum d'un animal immunisé les contiennent en même temps ; ces sérums chauffés perdent ces deux dites qualités en même temps ; ensemencés avec le microbe correspondant il les perdent, — après un séjour dans l'étuve (Gruber) — parallèlement. Nous-même, nous avons vu, dans des recherches faites au printemps 1898 dans l'Institut hygiénique de M. Gruber à Vienne, qu'en faisant disparaître par un chauffage une partie du pouvoir agglutinant d'un sérum immunisant, nous avons privé en même temps le sérum d'une partie analogue de ses corps sensibilisateurs, c'est-à-dire qu'un sérum rendu peu agglutinant ne donne aux microbes qu'une faible sensibilité envers les influences bactéricides d'un sérum. Des pareilles expériences ont été publiées par M. Trumpp[1] à Munich.

De là nous pouvons en effet conclure que ces substances sont dans le sérum intimement liées l'une à l'autre, qu'elles sont douées des mêmes affinités pour les bactéries correspondantes, qu'enfin elles doivent être entraînées simultanément par les substances albuminoïdes du sérum précipitées par la chaleur. Or, malgré les présomptions assez grandes en faveur de l'identité des deux substances, cette identité n'est pas encore acceptée.

En effet, il n'y a qu'un seul moyen pour élucider cette question : c'est la comparaison de la valeur préventive et agglutinante de *différents* sérums, empruntés à des animaux différents et produits dans des conditions différentes. Des observations de ce genre ont été faites à ce sujet par MM. Pfeiffer et Kolle[2], Fraenkel et Otto[3], qui ont conclu que le pouvoir agglutinant

1. Trumpp : *Archiv fur Hygiene*, XXX, 1. 2.
2. Pfeiffer et Kolle : *Centralblatt für Bakter.* 1896, XX, nos 4 et 5.
3. Fraenkel et Otto : *Münchener med. Wochenschrift*, 1897, n° 39.

d'un sérum n'est nullement en relation avec son pouvoir anti-infectieux.

Nous nous sommes trouvés à l'Institut Pasteur dans les conditions les plus favorables pour pousser plus avant ces études.

a) Développement du pouvoir agglutinant. — Dans des recherches non encore publiées, que nous avons poursuivies dans le laboratoire de M. Gruber, nous avons déjà établi par des mensurations journalières, que 1° une seule injection intrapéritonéale d'une culture chauffée typhique provoque déjà l'apparition des agglutinines dans le sérum des cobayes; 2° le schéma du développement de l'agglutination peut être traduit par une courbe, dont l'ascension commence vers le 3e ou 4e jour, quelquefois même à la fin de la 2e journée : elle atteint graduellement son maximum vers le 10e ou 12e jour, pour descendre ensuite lentement.

En continuant ces recherches sur des différents sérums à l'Institut Pasteur, nous n'avons que confirmé ces résultats. Les différents sérums présentaient dans les 4-5 premiers jours des titres agglutinants peu élevés : les sérums pris le 10e ou 12e jour possédaient pour la plupart un pouvoir agglutinant assez fort.

Disons d'abord quelques mots de notre méthode de titrage. Nous avons *pris pour titre agglutinatif d'un liquide la dilution minima qui, dans la goutte suspendue, dans l'espace d'une heure, donne encore naissance à des petits amas nettement distincts* d'au moins 10 à 15 individus microbiens. Cette méthode d'appréciation de la valeur agglutinante est selon nous préférable à cette autre méthode assez fréquemment employée, qui n'admet l'agglutination que quand elle est totale. En effet nous avons observé, dans des recherches faites antérieurement, que l'agglutination totale dépend beaucoup du nombre des microbes à agglutiner, car en rendant l'émulsion plus dense, il faut pour amener l'agglutination totale ajouter une plus grande quantité de sérum. De cette expérience il ressort que, les agglutinines se fixant aux corps microbiens, le pouvoir d'agglutination totale d'un sérum dépend en grande partie du nombre de microbes sur lesquels on le fait agir. Au contraire l'agglutination partielle, si nous avions soin d'exclure l'erreur qu'introduit le nombre des microbes en n'employant que des émulsions microbiennes très étendues, ne dépend que de la dilution du sérum.

Nos chiffres d'agglutination se rapportent toujours à la « dilution du sérum », et non à la relation entre les volumes de sérum et de culture. » En effet ces deux modes d'expression, quoique semblables, ne nous semblent pas être identiques. Il en est absolument de même pour l'action des substances antiseptiques sur le protoplasma microbien. On ne dit jamais : « une partie d'acide phénique tue 100 parties de telle culture. » mais bien : « l'acide phénique tue dans la dilution 1 0/0 tels microbes. » De même nous ne dirons jamais : « une goutte de sérum agglutine 100 gouttes de culture », mais, le « sérum dilué à 1 0/0 agglutine telle espèce de microbes ».

Voici notre méthode, que nous pratiquions toujours. Pour faire les dilutions : 5, 10, 20, 40, 60, nous préparons 5 verres de montre, dans lesquels nous déposons 4, 9, 19, 39, 59... parties de notre émulsion microbienne (15 c. c. de bouillon pour une culture sur gélose âgée de 16 heures) à l'aide d'une pipette capillaire, divisée en 1/500 c. c., nous ajoutons à chacun de ces verres avec la même pipette une partie de sérum, que nous mélangeons tout de suite en soufflant à la surface du mélange à travers la pipette; ceci fait nous laissons monter une petite colonne dans des tubes capillaires préparés dans ce but, nous en déposons une gouttelette sur la lamelle, que nous renversons sur la lame creuse, puis nous scellons les tubes capillaires, pour observer les modifications qui s'y passent. De cette façon-là nous pouvons observer les phénomènes macro et microscopiquement à divers moments de leur évolution. — Quand le titre d'un sérum surpassait 100, nous l'avons dilué d'abord à 1 : 20, et nous recommencions l'échelle.

Les dispositions exposées nous permettent d'établir à quel degré de dilution le sérum est encore agglutinant.

Le tableau suivant donne les titres d'agglutination déterminés dans le sérum de différents cobayes.

TABLEAU DES TITRES AGGLUTINANTS

Nos	Marque.	Jour.	Titre.	Notes.
1	A 42	2	20	Valeur normale.
2	A 38	2	15	— —
3	50	3	5	— —
4	45	3	< 5	— —
5	59	4	200	Brusque élévation.

6	F	4	20	
7	3	5	40	
8	A 43	5	100	
9	190	6	40	
10	190/2	6	160	
11	A 30	7	100	
12	35	7	150	
13	A 39	9	200	
14	A 4	10	300	
15	27 *a*	10	500	
16	21	10	1,500	
17*	78/30	11	150	Valeur exceptionnellement basse.
18	66	12	1,000	
19*	31	13	150	Valeur très basse.
20*	32	14	80	Valeur très basse.
21	34	14	1.000	
22	11	22	320	
23	11/*a*	27	400	

Les chiffres ci-dessus sont assez d'accord entre eux. Cependant les cas marqués d'un astérisque* offrent certaines particularités. Chez le n° 5 il y avait une apparition plus brusque du pouvoir agglutinant (notons que le sérum était en même temps exceptionnellement préventif); chez les 3 autres cobayes (n°s 17, 19, 20) le pouvoir agglutinant se perdait trop vite. L'un de ces trois animaux (n° 17) ne renfermait que peu de corps préventifs, *les deux autres montraient un pouvoir préventif bien actif.*

En général nous pouvons dire que la courbe du développement des agglutinines suit la même allure que celle des anticorps; nous n'avons trouvé que quelques rares (4 sur 23) exceptions à cette règle. Certaines circonstances individuelles inconnues chez les animaux font varier la quantité absolue des agglutinines dans leur sang.

b) Relations entre les corps préventifs et agglutinants. — Le tableau suivant nous donnera les résultats comparatifs du titrage parallèle de 27 animaux immunisés, soit des dératés avant ou pendant l'immunisation. soit des animaux normaux. Les résultats sont groupés selon la valeur du pouvoir préventif des sérums.

En examinant ces chiffres, nous voyons qu'il existe en effet un certain parallélisme entre les deux colonnes de chiffres; en comparant l'échelle des titres agglutinants moyens avec l'échelle des titres préventifs nous verrons le parallélisme très prononcé. Or, en général nous pouvons considérer les sérums les plus

agglutinants comme les plus riches en anticorps ; mais le parallélisme n'est pas assez strict pour qu'en visant *un* sérum spécialement dont nous connaissons le titre agglutinant, nous puissions prédire sa valeur préventive.

COMPARAISON DES TITRES PRÉVENTIFS ET AGGLUTINANTS

Nos	Marque.	Valeur préventive.	Titre agglut. moyen.	Titre agglut.	NOTES
1	3			40	
2	31			150	
3	D 24	0,05	640	500	Dératé au cours de l'immunisation.
4	66			1,000	
5	21			1,500	
6	190			40	
7	32			80	
8	41			320	
9	A 23	0,10	460	400	Dératé au cours de l'immunisation.
10	D 28			600	Dératé avant l'immunisation.
11	D 7			800	— — —
12	34			1,000	
13	190 2	0,15	280	160	
14	11			400	
15	A 14			50	Dératé au cours de l'immunisation.
16	D 1	0,20	250	200	Dératé avant l'immunisation.
17	27 *a*			500	
18	A 26			30	Dératé au cours de l'immunisation.
19	D 21	0,30	100	80	Dératé avant l'immunisation.
20	39			200	
21	A 32			5	Dératé au cours de l'immunisation.
22	A 24			20	— — —
23	A 20	0.50	40	10	— — —
24	F			20	
25	78 30			150	
26	50	1,00	5	5	
27	45	2,00	5	5	

En composant notre tableau selon les valeurs agglutinantes, nous démontrerons nettement que la même valeur agglutinante peut dans les différents sérums correspondre à des valeurs préventives, qui entre elles présentent d'énormes différences.

TABLEAU COMPARATIF RANGÉ SELON LES VALEURS AGGLUTINANTES

Agglutination.	Force préventive	Limites.
0 — 5	2,00, 1,00, 0,50	2,00 — 0,50
10 — 20	0,50, 0,50, 0,50	0,50
30 — 160	0,50, 0,30, 0,30, 0,20, 0,15, 0,10, 0,10, 0,05, 0,05	**0,50 — 0,05 !**
200 — 600	0,30, 0,20, 0,20, 0,15, 0,10, 0,10, 0,10, 0,05	0,30 — 0,05 !
800 — 1,500	0,10, 0,10, 0,05, 0,5	0,10 — 0,05

Un pouvoir agglutinant élevé correspond toujours à une valeur préventive forte, mais la valeur élevée préventive ne correspond pas toujours à une forte agglutination.

Le parallélisme entre le pouvoir préventif et agglutinant n'étant que superficiel, ne nous permet pas d'identifier les deux corps. Or, malgré la régularité de l'apparition du pouvoir agglutinant dans les sérums préventifs antityphiques, malgré la réaction, analogue et parallèle, des deux corps envers la chaleur et d'autres influences qui précipitent les substances albuminoïdes, malgré leur affinité parallèle pour les corps microbiens correspondants, en présence des résultats des titrages parallèles, nous pensons que l'*idée de l'unité de ces deux corps doit être définitivement abandonnée.*

L'étude des circonstances qui empêchent quelquefois la formation des agglutinines, tout en permettant la formation des corps préventifs, ne peut pas être faite. Dans la littérature nous ne trouvons qu'un mémoire qui pénètre un peu dans ces conditions de développement séparé des deux pouvoirs, c'est le travail de MM. Fränkel et Otto. Ces savants ont observé qu'après ingestion de grandes masses de cultures typhiques par le chien, le sang de cet animal, tout en ne possédant pas de propriétés préventives, montre un pouvoir agglutinant évident. Nos résultats confirment pleinement les données de ces auteurs.

2) *Où se forment les agglutinines?*

Dans la première partie de notre mémoire, nous avons exposé la méthode et les principes que nous avons suivis pour mettre en évidence les corps préventifs dans les organes. En suivant la même méthode, nous avons essayé de déterminer la valeur agglutinante des organes.

Les organes broyés avec du sable, puis étendus avec du bouillon, furent centrifugés après un séjour de 24 heures dans la glacière; nous avons ajouté le suc ainsi obtenu à des quantités croissantes de culture typhique. Après avoir vu que les organes comme le sérum ne perdent que peu de leur valeur agglutinante par la dessiccation, quelquefois nous nous servions de parties d'organes pesées, puis desséchées sur des lames en verre. Une fois desséchées, on peut les broyer sans addition de sable. Nos chiffres se rapportent dans tous les cas au poids de la masse fraîchement retirée. Ainsi, à une rate de

1 gram., nous y ajoutons 3 c. c. de bouillon: pour faire la dilution 1 : 20, nous prenons 4 parties de l'extrait + 16 parties d'émulsion de bacilles. De même : 4 parties du suc + 6 parties du bouillon donnent une dilution de 1 : 10 etc.

L'agglutination par le suc des organes ne s'observe pas aussi aisément que celle produite par le sérum ; malgré une centrifugation prolongée, le suc de certains organes (ganglions, foie, poumon) reste toujours un peu louche. Ce manque de transparence est dû à la présence de tout petits grains protoplasmiques, qui, par leurs mouvements browniens, peuvent gêner l'observation.

Pourtant les gros amas de bacilles agglutinés une fois formés, l'œil accoutumé les découvrira bien. Nous avons eu quelquefois l'occasion de voir ces granulations se grouper en petits amas, tout comme les microbes. C'était certainement le précipité de M. Kraus qui fixait ces petits granules les uns aux autres, de la même façon qu'il provoque, selon les expériences de M. Nicolle[1], l'agglutination de la poudre de talc émulsionnée dans des cultures filtrées. Dans ces cas, nous observons dans les tubes macroscopiques un éclaircissement total du liquide ; dans les autres, au contraire, l'aspect macroscopique des tubes de contrôle ne correspond pas à l'aspect microscopique, car malgré l'agglutination des microbes, qui ont gagné le fond du tube, le liquide ambiant conserve un léger trouble dû à la présence de petits granules non précipités. C'est toujours le microscope qui nous a servi pour la détermination du pouvoir agglutinant.

Nous avons pris pour ces expériences des précautions identiques à celles qui nous ont guidé pour la détermination du pouvoir agglutinant du sérum. Emulsion : 1 culture sur gélose âgée de 16 heures dans 15 c. c. de bouillon ; temps d'observation : une heure ; température : celle de la chambre ; agglutination-limite : plusieurs amas agglutinés (de 10 à 15 microbes) dans un champ visuel.

Parmi les organes examinés : le foie, les reins, les capsules surrénales montraient un pouvoir agglutinant presque toujours nul. Pour le foie, une fois nous avons observé la valeur de 1 : 10, quand le sérum a été de la valeur de 1 : 800.

1. Nicolle. Ces *Annales* 1898.

L'exsudat péritonéal ne renferme également que très peu d'agglutinines.

Les résultats relatifs aux organes lymphatiques, à la rate, la moelle, les ganglions lymphatiques sont les suivants :

TABLEAU COMPARATIF DU SÉRUM ET DES ORGANES LYMPHOÏDES

N°	Marque.	Jour.	Sérum.	Moelle.	Rate.	Ganglions.	NOTES
1	A 42	2	20	0	10	0	
2	A 38	2	15	5	0	0	
3	3	4	200	40	40		Ganglions non examinés.
4	A 43	5	100	20	20	25	
5	A 30	7	100	25	10		
6	A 39	9	200	40	20	< 20	
7	A 4	10	300	10	50	20	
8	78/30	11	150	120	80		

Dans un cas seulement, les chiffres se rapprochaient de ceux fournis par le sérum (n° 8); dans tous les autres cas il y avait une infériorité marquée pour les sucs d'organes.

Résultat : *Les organes lymphatiques, qui, au moins dans la moitié des cas observés, renfermaient plus d'anticorps que le sérum, ne renferment pas plus d'agglutinines typhiques.*

Examinons quel est l'effet de la splénectomie sur le développement des agglutinines. Le tableau suivant nous fournira des renseignements sur ce sujet-là.

SPLÉNECTOMIE ET AGGLUTINATION

Nos	Marque.	Jour.	Sérum.	Moelle.
1	D 21	7	80	10
2	D 4	8	200	0
3	D 28	10	600	20
4	D 7	11	800	40
5	D 24	12	300	20

Un simple coup d'œil sur ce tableau permet de constater que la marche du développement n'a pas changé. *Les agglutinines se développaient parfaitement chez les animaux splénectomisés.* (Nous rappelons que c'était absolument le même cas pour les corps préventifs). Aucun des organes ne renfermait les agglutinines en plus grande quantité que le sérum.

Quel est le développement des agglutinines chez les animaux splénectomisés au cours de l'immunisation? A voir le tableau suivant.

SPLÉNECTOMIE TARDIVE ET AGGLUTINATION

Nos	Marque.	Splénectomisé après	Saigné à blanc après	Sérum.	Moelle.	Ganglions mésentériq.	NOTES
1	A 26	3 jours.	8 jours.	30	0	5	Diminution.
2	A 20	3 —	7 —	10	5	0	Diminution considérable.
3	A 23	3 —	14 —	400	15	5	Valeur normale.
4	A 24	5 —	10 —	20	10	0	Diminution.
5	A 32	5 —	11 —	5	0	0	Diminution très forte.
6	A 14	5 —	11 —	50	0	—	Légère diminution.

La splénectomie faite quelques jours après l'injection immunisante empêcha dans trois cas sur six (nos 2, 4, 5,) la formation des agglutinines; dans deux cas (nos 1, 6) il y avait une

déchéance considérable de la valeur; dans un cas (n° 3), l'opération n'influença en rien la marche du phénomène.

Retenons ces deux faits-ci : 1° La rate ne renferme pas plus d'agglutinines que le sérum; 2° l'enlèvement de la rate 3-5 jours après l'injection immunisante empêche la formation des agglutinines. Ces deux faits sont-ils en contradiction ? Nullement. En effet, la rate peut très bien renfermer au début de l'immunisation les substances « agglutogènes », c'est-à-dire des substances de provenance microbienne, qui se transforment en agglutinines sans que cette transformation se fasse dans la rate même. Dans la première partie de notre mémoire, où nous exposions notre procédé pour mettre en évidence ces substances intermédiaires « agglutogènes », nous croyons avoir réussi à prouver l'existence réelle des substances agglutogènes dans les rates mêmes. Remarquons, d'autre part, que les substances agglutogènes — comme nous l'avons déja signalé — se trouvent quelques fois également dans le sang ; le fait, que la rate ne représente qu'un des filtres des substances en question, nous explique bien pourquoi la splénectomie tardive est dans une partie des cas sans influence sur le développement des agglutinines.

De tous ces phénomènes mentionnés, puisque nous n'avons pas trouvé des organes qui renfermeraient plus d'agglutinines spécifiques que le sérum, nous ne pouvons tirer des conclusions qu'avec beaucoup de précautions. Les subtances agglutogènes se trouvent certainement dans le sang, comme dans la rate, mais l'endroit de leur transformation nous est resté obscur. Est-ce que les agglutinines se forment pourtant dans les mêmes organes et par les mêmes cellules que les corps préventifs ? Peut-être. Il nous serait alors permis de supposer qu'aussitôt sécrétées, elles abandonnent les cellules formatrices pour se répandre dans le sang. Ou bien c'est dans le sang même qu'elles se forment ?

Ces recherches relatives aux organes lymphatiques, accusés par MM. Pfeiffer et Marx d'être les organes formateurs des agglutinines, n'ont pas abouti à des résultats sûrs. Mais d'autre part, elles ont confirmé notre opinion à propos des relations entre les agglutinines et les corps préventifs. *Nous considérons la discordance absolue entre la valeur préventive et agglutinante des rates des animaux immunisés comme une nouvelle preuve de l'existence*

séparée des deux substances : des corps préventifs et des agglutinines.

De tous les autres organes, nous n'en avons trouvé qu'un seul, qui nous donnait des valeurs agglutinatives supérieures à celles des sérums, et c'est le *poumon.*

3) *Recherches sur les substances agglutinantes du poumon.*

Le tableau suivant donne les résultats du titrage comparatif des agglutinines du poumon et du sérum de différents animaux. Nous ferons remarquer qu'avant de broyer nous avons toujours pris soin d'exprimer le sang des capillaires du poumon, aussi complètement que possible.

VALEURS AGGLUTINANTES DU POUMON ET DU SÉRUM CHEZ DES ANIMAUX IMMUNISÉS

Nos	Marque.	Immunisé depuis.	Poumon.	Sérum.	NOTES
1	A 42	2	200	20	
2	A 38	2	> 400*	15	
3	A 43	5	200	100	
4	A 30	7	150	100	
5	A 39	9	300	200	
6	D 21	7	200	80	
7	D 1	8	> 300*	200	Splénectomisés avant l'injection immunisante.
8	D 28	10	300	600	
9	D 7	11	200	800	
10	A 20	7	100	10	
11	A 26	8	50	30	Dératés au cours de l'immunisation.
12	A 14	11	50	50	
13	A 32	11	100	5	
14	A 23	14	200	400	

* Le titre-limite n'a pas été déterminé.

L'extrait des poumons provenant des animaux immunisés a montré un pouvoir agglutinant très prononcé. Dans 2 cas

nous notons un titre de 50, dans 5 cas de 100, dans 6 cas de 200, dans 2 cas de 300.

Cette constatation semble étrange : en effet, à notre connaissance, on n'a pas encore signalé ces faits. Nous avons recherché d'abord s'il y a des relations constantes entre la valeur agglutinante des sérums et celle des poumons, ce qui mettrait en évidence le poumon, comme endroit de formation des agglutinines. Un examen approfondi du tableau nous démontre *qu'il n'y a pas de parallélisme entre les deux valeurs*. Dans les premiers jours, le poumon est supérieur au sérum (10-20 fois !) mais plus tard, quand le sérum acquiert des propriétés agglutinantes fortes, la valeur agglutinante ne semble pas être sensiblement augmentée (nos 8, 9, 14). *Bref, le pouvoir agglutinant du poumon semble être différent et indépendant du pouvoir agglutinant du sérum.*

En présence des titres relativement élevés dans les deux cas provenant du deuxième jour (nos 1, 2), nous nous sommes demandé si ce pouvoir agglutinant du poumon ne serait pas une faculté inhérente au tissu pulmonaire, en d'autres termes, si le poumon neuf, provenant d'un animal non immunisé, n'agglutinerait pas également ?

Quelques examens ont suffi pour prouver qu'en effet c'est le cas. Voici le tableau comparatif des valeurs agglutinantes du poumon de quatre animaux neufs, en comparaison avec les valeurs agglutinantes des sérums correspondants.

Nos.	Marque.	Poumon.	Sérum.
1	A 51	60	5
2	A 50	100	5
3	A 49	200	20
4	A 48	300	20

Le poumon des cobayes neufs est doué d'un pouvoir agglutinant remarquablement fort, qui surpasse 10-20 fois celui du sérum neuf.

Nous publions quelques notes de notre cahier d'expériences :

Dilution.	Suc du poumon fraîchement préparé (A 49).	SÉRUM (A 49).
1 : 12	En 15 minutes agglutination complète. Énormes masses.	En 15 minutes quelques petits amas composés de 4-6 bacilles.
1 : 20	15 minutes : aggl. complète.	15 minutes : rien ; 60 min. groupes de 10-15 individus, beaucoup de microbes isolés.
1 : 40	10 minutes : agglutination complète. Grandes masses agglutinées, etc.	60 minutes : quelques petits amas formés de 4-6 indiv., etc.

La différence est assez éclatante.

Nous venons de découvrir des substances agglutinantes du poumon neuf ; nous en réservons l'étude complète pour des recherches ultérieures : ici nous ne ferons qu'exposer les résultats de quelques expériences, relatives aux dites substances.

D'abord nous avons cherché cette action agglutinante chez d'autres espèces d'animaux. Nous l'avons retrouvée chez un lapin (1/50), le rat (1/50), la souris (1/100), de même que chez le cobaye nouveau-né ; ainsi ce ne sont pas les microbes aspirés pendant la vie qui sont la cause de cette agglutination. Dans le cas étudié, le poumon agglutinait jusqu'au 1/200, tandis que le sérum n'agglutinait le bacille typhique que jusqu'à 1/20.

D'autre part, nous avons constaté que le colibacille (1/100), les bacilles de la peste (1/60), les vibrions du choléra « Prusse orientale » (1/80), étaient également agglutinés par le suc examiné (A 49 neuf).

Quant à l'aspect microscopique des gouttes suspendues, l'agglutination se présentait sous la forme bien connue. Le suc des poumons peu dilué (1/20, 1/40) paralyse et agglutine presque instantanément les bacilles typhiques, qui forment alors des amas très volumineux. Les petites granulations protoplasmiques pro-

venant des cellules pulmonaires s'agglutinent également, elles se joignent aux amas bacillaires et se précipitent avec eux. De cette précipitation des corpuscules suspendus non microbiens, nous concluons que, probablement, c'est un précipité analogue à celui décrit par M. Kraus, qui est la cause de l'agglutination « pulmonaire ».

En se servant de sucs pulmonaires de plus en plus étendus, l'agglutination cesse d'être complète ; la majorité des microbes conservent — même agglutinés — leur mobilité, et on voit alors des amas composés de 10-20 microbes se remuer vivement, poussés par des bacilles restés isolés et bien mobiles. Nous avions l'impression très nette que l'action paralysante des agglutinines pulmonaires est moins prononcée que celle des agglutinines spécifiques du sérum immunisant. C'est pourquoi les cultures moins mobiles, âgées de 2-3 jours, sont plus vite et plus complètement agglutinées que les cultures jeunes en bouillon.

Les agglutinines du poumon se conservent très bien dans le poumon *desséché*; l'extrait des poumons secs et broyés après quatre semaines agglutine aussi bien que le suc fraîchement préparé. Au contraire un *suc conservé* pendant quatre jours dans la glacière perdait une grande partie (3/4) de son activité.

Quant à l'action du chauffage, nous avons constaté que l'extrait de poumon y est très sensible. Le pouvoir agglutinant d'un échantillon (A 48), chauffé à 65° pendant 30', est tombé de 300 à 10, quand le sérum provenant du même animal conservait sa valeur initiale (20), presque entièrement (15). Le même suc chauffé à 60° pendant 30' n'agglutinait qu'au 1/20, alors que la valeur du sérum correspondant n'a pas changé du tout. Nous croyions avoir trouvé un moyen de différenciation des deux sortes d'agglutinines, mais il n'en était rien. Nous avons en effet remarqué que le suc du poumon chauffé à 60° se coagule considérablement, tandis que le sérum ne change pas d'aspect ; cela nous a conduit à penser que c'était la présence de certains corps albuminoïdes dans le suc pulmonaire qui, très vite coagulables, empêcheraient par leur coagulation l'action des agglutinines. Pour examiner cette éventualité, nous ajoutions à un suc pulmonaire récemment préparé un sérum de la valeur agglutinante de 400, et nous chauffions le mélange (fait à parties égales)

à 60° pendant 30. Au bout de ce temps, le contenu du tube devint tout blanc, crémeux, et parallèlement avec la précipitation de l'albumine le pouvoir agglutinant du liquide s'abaissa jusqu'à 20. Nous voyons que le chauffage ne permet pas la séparation des agglutinines pulmonaires de celles du sérum.

Il est certain que les agglutinines pulmonaires ne sont nullement en relations avec les anticorps. Les sucs de poumons différents, de valeur agglutinante élevée (50, 100, 300) n'ont pu protéger les cobayes contre la dose *minima* mortelle du bacille typhique, aux doses de 0,15, ni de 0,50, ni de 1,00 gramme. Les animaux qui ont reçu le virus additionné avec l'extrait pulmonaire ont, au contraire, toujours succombé plus vite, ce qui est dû vraisemblablement à l'action des autres microbes introduits ensemble avec le suc pulmonaire. La cavité péritonéale des animaux succombés renfermait en effet, en dehors des bacilles typhiques qui y pullulaient, assez souvent d'autres microbes, entre autres un pneumocoque qui, peut-être, représente un hôte habituel du poumon des cobayes. Il est cependant incontestable que les animaux ont succombé à une infection typhique, puisque nous avons retrouvé d'une façon constante le bacille d'Éberth dans le sang.

Les agglutinines pulmonaires ne sont pas en relations avec les agglutinines spécifiques. On ne peut, au contraire, donner aucune preuve de leur non identification avec les agglutinines normales des sérums. Ni l'un, ni l'autre de ces corps n'est spécifique, et leurs valeurs sont assez parallèles. Le tableau de la page suivante donne des valeurs comparatives des sérums et des poumons neufs observés.

Nous tâcherons, dans des recherches ultérieures, d'élucider le rôle et la nature des *agglutinines pulmonaires* : actuellement nous nous contentons de ces données.

Résumons le résultat de nos recherches faites sur le développement et le rôle des agglutinines :

1.) L'injection intrapéritonéale d'une culture typhique chauffée provoque chez le cobaye l'apparition d'un pouvoir agglutinant du sérum.

2.) L'apparition et le développement de ce pouvoir est soumis aux mêmes règles que le développement des anticorps : il

apparaît vers le 3-4 jour, va en augmentant jusqu'au 10-13 jour et descend lentement. Les valeurs correspondantes varient chez les différents animaux assez sensiblement.

TABLEAU COMPARATIF DE LA VALEUR AGGLUTINANTE DES POUMONS ET SÉRUMS NEUFS

Valeur du sérum.	Animal.	Valeur du poumon.
< 5	Lapin	50
	Rat	50
	Souris	100
5	Cobaye	100
	Cobaye	60
20	Cobaye	200
	Cobaye	200
	Cobaye	300

3.) Les deux courbes marchent en général à une allure sensiblement parallèle; elles ne sont pas cependant superposables. Les sérums agglutinants à forte dilution sont toujours bien préventifs, mais il y a des sérums d'un pouvoir agglutinant faible qui, néanmoins, renferment des anticorps en assez grande quantité. Le parallélisme n'étant pas absolu, l'identité des agglutinines et des anticorps ne peut être maintenue. Le pouvoir agglutinant ne peut être considéré comme étant la base du pouvoir immunisant ; il l'accompagne dans la majorité des cas, mais pas toujours.

4.) Quant aux organes des animaux immunisés : le foie, les reins, les capsules surrénales ne contiennent que des traces des agglutinines.

5.) Les organes lymphoïdes (la rate, la moelle des os, les ganglions) en renferment des quantités variables, sans atteindre la valeur du sérum.

6.) La splénectomie précédant l'injection immunisante n'empêche pas la formation des agglutinines ; la splénectomie, faite 3-5 jours après l'injection, empêche nettement la formation des agglutinines qui, dans la majorité des cas, n'apparaissent qu'en quantité inférieure à la normale. La rate doit renfermer des pro-

duits de provenance microbienne, qui provoquent la formation des agglutinines. L'endroit de transformation des substances agglutogènes en agglutinines n'a pu être retrouvé par le titrage comparatif des organes et du sérum; les agglutinines, peut-être aussitôt sécrétées, passent dans le sang, ou bien c'est dans le sang même qu'elles se forment.

7.) Les poumons peuvent être considérés comme les seuls organes du cobaye, qui possèdent dans la majorité des cas observés une valeur agglutinante supérieure au sérum. Cette action de l'extrait pulmonaire, n'étant pas spécifique, doit être considérée comme absolument indépendante de l'action des agglutinines spécifiques du sérum immunisé. Les agglutinines pulmonaires sont faciles à retrouver dans les poumons des animaux neufs de différentes espèces, ainsi que chez le cobaye nouveau-né. Au contact avec des cultures, elles précipitent en les agglutinant les divers microbes (typhus, coli, peste, choléra) ainsi que des petits grains protoplasmiques de provenance cellulaire. Elles sont résistantes à la dessiccation, peu résistantes à un chauffage. Certaines analogies désignent les agglutinines normales comme dérivant des agglutinines pulmonaires.

8.) Le suc du poumon neuf est la première humeur animale connue qui, tout en étant fortement agglutinante, ne renferme pas des corps préventifs.

SUR LA MALTODEXTRINE

Par M. H. POTTEVIN

Dans mon dernier mémoire (ces *Annales*, page 665), j'ai toujours raisonné dans l'hypothèse où l'amidon, sous l'action de l'amylase, donnerait comme uniques produits des dextrines non réductrices et du maltose. Un certain nombre de savants ont admis la formation de corps intermédiaires, dont le pouvoir rotatoire et le pouvoir réducteur correspondraient toujours à des mélanges en proportions convenables de maltose et de dextrine, et qui dans certaines circonstances se comporteraient autrement que les mélanges artificiellement obtenus de ces deux substances. Il faudrait donc leur accorder une individualité propre : tels seraient les dextrines réductrices de Musculus, la maltodextrine de Herzfeld et de Brown et Morris, l'isomaltose de Lintner, etc... Si nous voulons expliquer d'une façon complète le phénomène de la saccharification, il nous faut maintenant étudier ces substances, et examiner dans quelle mesure leur existence, en tant que corps définis, paraît établie ou probable. Je bornerai mon examen aux deux d'entre elles qui s'imposent le plus à l'attention par l'autorité des savants qui les ont décrites, la maltodextrine et l'isomaltose; ce que je dirai d'elles pourra d'ailleurs s'appliquer à toutes les autres, les arguments invoqués sont toujours les mêmes, la discussion serait toujours la même aussi. Commençons par la première.

Herzfeld a, le premier, préparé une « maltodextrine » ; dans leur mémoire de 1885, Brown et Morris ont décrit une maltodextrine qui ne ressemble pas tout à fait à celle de Herfzeld, mais qui, à leur sens, n'en diffère pourtant pas d'une façon essentielle, car ils disent : « Nous sommes absolument convaincus que Herzfeld a eu entre les mains, quoique à l'état impur, la substance que nous avons nous-même retirée de la portion la

plus soluble dans l'alcool des mélanges en voie de saccharification, et que nous considérons comme une combinaison de maltose et de dextrine. » C'est à celle-ci que je rapporterai mon étude.

La maltodextrine de Brown et Morris n'est pas facile à préparer : elle provient d'une saccharification arrêtée à son début et soumise à des précipitations fractionnées par l'alcool. Le produit est ensuite soumis à une fermentation qui y fait disparaître un peu de sucre, et le résidu non attaqué correspond à :

Maltose	31,6
Dextrine	68,4

ce qui fait à peu près une partie de maltose pour deux parties de dextrine.

Mais, pour Brown et Morris, ce corps n'est pas un mélange, c'est une combinaison. Il se distingue en effet d'un mélange artificiel de maltose et de dextrine par les trois points suivants :

1° La levure de bière (sacch. Cerivisiæ des fermentations hautes) est sans action sur la maltodextrine, tandis qu'elle détruit sans peine le maltose surajouté et celui d'un mélange en proportions équivalentes fait avec de la dextrine et du maltose pur ;

2° Par des précipitations fractionnées à l'alcool, on sépare le maltose presque complètement de la dextrine, tandis qu'on n'arrive pas à défaire la maltodextrine ;

3° La maltodextrine, traitée par l'extrait de malt à 60°, est intégralement transformée en maltose, ce qui n'a pas lieu pour les dextrines ordinaires qui laissent toujours un résidu non saccharifié (cet argument ne ressort pas nettement de l'expérience citée de Brown et Morris, puisque la dextrine apparente de leur maltodextrine n'a donné que 70 0/0 de sucre ; je prends l'argument tel qu'il est formulé dans leurs conclusions.)

Quand on lit le mémoire de Brown et Morris, on remarque que la dextrine apparente de leur maltodextrine et celle du mélange artificiel qui leur a servi de terme de comparaison, traitées dans les mêmes conditions par la diastase, ne fournissent pas les mêmes quantités de sucre : elles ne sont donc pas identiques, donc pas comparables. N'y aurait-il pas là de quoi expliquer la différence des réactions observées? Je vais montrer qu'il en est bien réellement ainsi.

La méthode de fermentation adoptée par MM. Brown et Morris, qui consiste à mettre en présence de la solution sucrée une certaine quantité de levure lavée sans précautions aseptiques, et à laisser à l'étuve pendant 12 jours ce mélange au sein duquel la fermentation est vite arrêtée, m'a paru trop exposée à l'intervention des microbes; aussi ai-je procédé d'une autre façon. J'ai préparé de l'eau de levure que j'ai additionnée d'asparagine à la dose de 2 grammes par litre, stérilisée par filtration à la bougie Chamberland et répartie dans des ballons stériles : les mélanges que je voulais faire fermenter étaient stérilisés à l'autoclave, puis ajoutés avec pureté dans les ballons d'eau de levure ainsi préparés : le tout, ensemencé avec une levure de brasserie (sacch. Cerivisiæ de fermentation haute) était mis à l'étuve à 22°-23°; grâce aux précautions prises, on peut laisser l'opération aller à son terme sans craindre l'intervention des microbes.

12 litres d'empois de fécule à 5 0/0 ont été traités à 65° par 1gr,5 de diastase précipitée, l'opération arrêtée au bout de 1/4 d'heure a donné un mélange contenant pour 100 de matière dissoute :

Maltose	15,8
Dextrine	84,2

Le liquide concentré à consistance de sirop a été additionné d'alcool absolu, de façon à porter le titre alcoolique à 90 0/0; le précipité a été repris et épuisé à l'ébullition par l'alcool à 70 0/0; en réunissant les liquides d'épuisement et chassant l'alcool, j'ai obtenu un mélange contenant :

A	Maltose	45,2
	Dextrine	54,8

Si la maltodextrine existe, il doit s'en trouver dans ce mélange.

J'ai préparé deux séries de cinq ballons d'eau de levure asparaginée et j'ai ajouté pour 100 c. c. d'eau de levure :

Dans les ballons de la série I, 20 c. c. d'une solution à 25 0/0 du mélange A plus 40 c. c. d'eau.
— — II, 60 — — — 0 —

Tous ces ballons ont été ensemencés avec une levure haute de brasserie etiquetée au laboratoire de l'Institut Pasteur « Levure de Burgelin » et mis à l'étuve à 22°; l'examen fait à époques successives a donné :

	SÉRIE I		SÉRIE II	
	Maltose.	Dextrine.	Maltose.	Dextrine.
Au début	2,26	2,74	6,78	8,22
Après 5 jours	1,52	2,74	4,83	8,22
— 10 —	1,37	2,74	4,12	8,22
— 3 semaines	1,36	2,74	4,12	8,22

Le résidu non fermenté correspond dans l'expérience précédente :

Pour la série I.........	Maltose...............	33,1
	Dextrine..............	66,9
Pour la série II........	Maltose...............	33,4
	Dextrine..............	66,6

C'est la maltodextrine de Brown et Morris, et, comme dans leurs essais, l'addition d'une certaine quantité de maltose pur est sans influence sur la composition du résidu final.

J'ai préparé deux séries de 4 ballons contenant chacun 50 c. c. d'eau de levure asparaginée, 30 c. c. d'une solution à 25 0/0 du mélange A qui a servi pour l'expérience précédente, et en outre dans la série II, 4 grammes de maltose pur; tous les ballons, ensemencés avec la levure de Burgelin, ont été mis à l'étuve à 22° et examinés au bout de temps variables; ils ont donné :

	SÉRIE I		SÉRIE II	
	Maltose.	Dextrine.	Maltose.	Dextrine.
Au début.........	6,78	8,22	10,78	8,22
Après 4 jours.....	5,10	»	8,40	»
— 8 —	4,20	»	4,25	»
— 15 —	4,20	»	4,20	»

Si la fermentation s'arrête, disent Brown et Morris, c'est que le sucre fermentescible est épuisé. La vie d'un être est quelque chose de très complexe, et c'est s'en faire une idée trop simple que de rapporter ses manifestations aux variations d'un unique facteur; dans le cas présent, les proportions relatives de sucre, de dextrine, et d'alcool, interviennent simultanément pour ralentir l'action de la levure; l'influence prépondérante est celle de la dextrine, et plus exactement de la qualité de la dextrine.

J'ai préparé deux liquides en ajoutant à 50 c. c. d'eau de levure, d'une part (liquide α) 7gr,6 du mélange maltose-dextrine A qui a servi pour les expériences précédentes; d'autre part (liquide β) 3gr,4 de maltose pur et 4 grammes d'une dextrine soluble dans l'alcool à 70° obtenue sans production de sucre, comme je l'ai indiqué précédemment; un troisième liquide γ contient, dans 50 c. c. d'eau de levure, 3gr,4 de maltose pur et 4gr,5 d'une dextrine précipitée par l'alcool à 60 0/0 d'un sirop fourni par une saccharification arrêtée au début.

J'ai ainsi d'une part le mélange maltose-dextrine dont j'ai déjà étudié les qualités fermentatives, d'autre part deux mélanges artificiels faits dans les mêmes proportions, mais avec des dextrines différentes : traitées par la diastase à 60° dans des conditions identiques, les dextrines de ces divers mélanges ont donné :

Dextrine du mélange α...........	92,5 0/0 de maltose.
— — β...........	94,0 —
— — γ...........	47,1 —

Les dextrines α et β sont identiques, elles diffèrent de la dextrine γ qui, de son côté, se rapproche de celle employée par Brown et Morriss.

Les liquides α, β, γ ont été ensemencés avec la levure de Burgelin et mis à l'étuve à 22°. L'examen fait à époques successives a donné :

	MALTOSE DANS 100 c. c.		
	α	β	γ
Au début................	6,6	6,8	6,8
Après 8 jours...........	4,0	3,8	1,2
— 15 —	4,0	3,8	0,8

Les liquides α et β de l'expérience précédente se comportent de la même façon; ils contiennent pourtant, mélangés à des dextrines identiques, l'un le maltose apparent de la maltodextrine, l'autre du maltose pur; le liquide γ, qui contient une dextrine différente, est rapidement privé de la presque totalité de son sucre; la qualité de la dextrine intervient manifestement, et nous voyons pourquoi l'expérience comparative faite par Brown et Morris n'a pas la valeur qu'ils lui ont attribuée. Les dextrines diverses qui se montrent différentes quant à leur résistance à la diastase, quant à leur solubilité dans l'alcool, sont différentes aussi quant à la façon dont elles interviennent pour retarder, puis arrêter l'action de la levure de bière.

Du mélange fourni par une dextrinisation faite sans production de sucre, j'ai séparé quatre portions :

L'une A précipitée par l'alcool à 50 0/0.
L'autre B soluble dans l'alcool à 50 0/0, précipitée par l'alcool à 60 0/0.
— C — — 60 — — 70
— D — — 70

J'ai préparé des liquides de culture contenant dans 100 c. c. d'eau de levure 6 grammes de ces différentes dextrines et en plus uniformément 5 grammes de maltose pur.

Tous ces liquides ensemencés et mis à fermenter à 22° par la levure de Burgelin ont donné :

	SUCRE RESTANT EN 100 c. c.			
	A	B	C	D
Après 8 jours.....	0,5	0,8	1,3	2,85
— 15 —	0,0	0,1	0,5	2,7
— 24 —	0,0	0	0,4	2,7

A mesure que les dextrines avancent dans la voie de la décoagulation, leur action retardative vis-à-vis de la levure s'accentue.

Les particularités signalées par Brown et Morris sont donc exactement observées, mais l'interprétation qu'ils en donnent n'est pas prouvée; de ce que le maltose apparent de la maltodextrine ne fermente pas, on ne peut pas conclure qu'il est infer-

mentescible, puisque le phénomène se reproduit avec du maltose authentique, uni à une dextrine voisine de celle qui doit entrer dans la maltodextrine.

Le second argument de MM. Brown et Morris est celui-ci : « La maltodextrine ne peut être séparée en maltose et dextrine par un traitement à l'alcool ; de quelque façon qu'on s'y prenne, elle se dissout et se précipite en bloc, comme une substance homogène. » Cette affirmation est contredite par Lintner et Düll, et aussi en désaccord avec l'expérience qui suit.

En épuisant par l'alcool à 70 0/0 le mélange fourni par une saccharification arrêtée au début, et faisant fermenter par la levure haute, j'ai préparé un produit correspondant à :

Maltose	31,3
Dextrine	68,7

Une solution sirupeuse de ce mélange a été soumise aux précipitations fractionnées par l'alcool : au sirop chaud j'ai ajouté de l'alcool absolu bouillant jusqu'à ce qu'il se forme un trouble persistant, j'ai laissé refroidir, j'ai filtré et j'ai continué ainsi aussi longtemps que l'addition de quantités nouvelles d'alcool m'a permis d'obtenir un nouveau dépôt ; les précipités successifs ont été repris par l'eau, maintenus quelque temps au bain-marie pour chasser l'alcool entraîné puis analysés ; ils ont donné :

Titre alcoolique du liquide au sein duquel s'est formé le précipité.	Poids de matière précipitée.	Composition du précipité. Maltose 0/0	Dextrine 0/0
—	—	—	—
58	5,7	20	80
70	8,1	26	74
87	11,7	31	69
94	2,1	40	60
Substance restée dissoute dans l'alcool à 94 0/0.	2,4	70	30

Enfin pour discuter l'argument tiré de ce que la dextrine apparente de la maltodextrine est entièrement transformée en maltose par l'amylase agissant à 60°, je n'ai qu'à me reporter à ce que j'ai dit dans mon dernier mémoire au sujet des dextrines ; j'ai montré que les portions les plus labiles de l'amidon, celles qui, dans une dextrinisation arrêtée à son début, ont déjà atteint l'état de dextrines solubles dans l'alcool fort, sont aussi celles qui, par la suite, seront le plus facilement transformées en maltose ; ce sont ces dextrines que Brown et Morris isolent par leur traitement à l'alcool à 70 0/0 et qu'ils considèrent comme entrant dans la constitution de la maltodextrine ; ces dextrines sont transformables en maltose comme toutes les autres, elles

le sont plus facilement il est vrai, mais cela est indépendant de l'existence d'une combinaison maltose-dextrine.

Aux arguments que nous venons de discuter, Brown et Morris en ont ajouté d'autres de moindre importance :

Je n'en citerai qu'un, réservant les autres pour un prochain travail sur l'isomaltose.

Cet argument est que la maltodextrine dialyse tout d'une pièce, sans séparation de ses éléments constituants. Ceci est en désaccord avec l'expérience qui suit.

J'ai préparé une maltodextrine en procédant comme je l'ai déjà indiqué à plusieurs reprises, j'ai mis dans deux dialyseurs des solutions à 10 0/0, faites l'une (A) avec la maltodextrine, l'autre (B) avec un mélange de maltose pur et de dextrine; celle-ci avait été isolée par l'alcool à 70 0/0 des produits d'une dextrinisation faite sans production de sucre, le mélange était tel que les deux composants s'y trouvaient dans les mêmes proportions que dans le liquide A; j'ai ajouté un peu d'acide phénique pour éviter l'intervention des microbes, l'eau des dialyseurs était changée de six heures en six heures; je mesurais chaque fois les quantités de sucre et de dextrine passées :

	A		B	
	Maltose.	Dextrine.	Maltose.	Dextrine.
Première prise......	2,5	3,8	2,4	3,2
Seconde —	1,4	2,2	1,2	1,8
Troisième —	0,7	1,6	0,9	1,7

Le mélange A soumis à la dialyse contenait :

Maltose	32,5
Dextrine..............................	67,5

La dialyse marche d'un pas à peu près égal pour la maltodextrine, qui ne passe pas entière, et pour le mélange artificiel; les diverses dextrines dialysent avec des vitesses différentes; celles qui sont le plus solubles dans l'alcool sont celles qui passent le plus vite, elles passent presque aussi vite que le maltose; comme ce sont elles qui entrent dans la maltodextrine, on conçoit très bien que dans certains cas il puisse y exister entre la composition de la substance qui reste sur le dialyseur et celle de la substance qui l'a traversé une différence moins grande encore que celle que j'ai trouvée dans l'expérience précédente.

PRÉPARATION DE LA CASÉINE COMME AGENT PYOGÈNE

PAR J. COLARD.

On est souvent obligé, dans les laboratoires de bactériologie, de se servir de produits connus sous le nom d'*aleuronates* pour obtenir du pus : c'est Buchner qui, en 1890, a proposé la caséine végétale, substance produisant facilement la suppuration de certains tissus et principalement de la plèvre. C'est au moyen du pus ainsi obtenu que l'on peut étudier les extraits leucocytaires, les propriétés préventives et bactéricides, etc.

Les aleuronates fournis par le commerce sont malheureusement des produits le plus souvent impurs : en tout cas, au laboratoire de bactériologie de Liège, on n'eut guère que des mécomptes avec les substances fournies sous ce nom par divers fournisseurs français et allemands. Nous nous sommes décidés à en préparer nous-mêmes, et voici la méthode qui a donné le meilleur produit, doué d'un pouvoir pyogène très considérable, comme l'a constaté M. Gengou dans ses expériences.

On prépare d'abord du gluten par le procédé ordinaire, en malaxant sous un filet d'eau de la farine de froment renfermée dans un petit sac de toile, et cela jusqu'à ce que l'eau passe incolore, ce qui indique que tout l'amidon est éliminé. Un kilogramme de farine donne environ 150 grammes de gluten humide. Cent grammes de ce gluten sont mis en macération avec 4 litres d'eau contenant 4 grammes de potasse caustique par litre : on laisse en contact pendant quelques jours en agitant de temps en temps jusqu'à dissolution du gluten : on décante ou on passe à la toile : on ajoute au liquide de l'acide acétique en très léger excès. Le gluten purifié se reprécipite : cette précipitation est activée en chauffant légèrement si l'opération se fait en hiver.

On épuise le gluten successivement par l'alcool à 60°, puis par l'alcool à 80°, enfin par l'alcool absolu à l'effet de dissoudre la fibrine végétale contenue dans le gluten. On sèche doucement le résidu insoluble qui est la caséine végétale. Le produit doit

être conservé en flacon dessiccateur. Un kilogramme de farine en fournit environ 20 grammes.

La caséine du gluten est presque insoluble dans l'eau, à l'état sec. Elle se dissout dans les solutions alcalines diluées d'où l'HCl étendu la reprécipite; ce précipité se redissout dans l'eau par l'addition de quelques gouttes de solution sodique. En solution alcaline, elle donne avec le ferrocyanure potassique un précipité qui devient plus fort par l'addition d'acide acétique. Ce caractère la distingue de la caséine protéique qui ne donne pas de précipité avec le ferrocyanure.

La caséine végétale est très leucocytophile en solution faiblement alcaline. Pour l'employer, on la fait digérer avec une solution de potasse à 0,5 0/0 à la température de 37°. On la reprécipite par l'HCl dilué, puis on la redissout dans l'eau additionnée de quelques gouttes de solution de soude caustique.

Pour provoquer la suppuration, il suffit d'injecter dans la plèvre 8 à 10 c. c. de cette solution alcaline à 5-10 0/0 : le surlendemain, on retire une quantité à peu près égale de pus.

On peut aussi retirer la caséine végétale des graines de légumineuses.

Liège, Institut bactériologique, 1899.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

13me ANNÉE OCTOBRE 1899 N° 10

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA RÉSORPTION DES CELLULES

Par EL. METCHNIKOFF

INTRODUCTION

Il y a au moins cinquante ans qu'on enseigne que notre organisme est un État composé d'éléments plus ou moins indépendants, qui se réunissent en un ensemble harmonieux pour accomplir les fonctions vitales. On a bien reconnu les caractères particuliers des diverses catégories de cellules qui constituent un organisme, et on a constaté qu'il y a parmi elles des éléments nobles, plus différenciés, et des cellules d'ordre inférieur, plus simples dans leur structure et leur fonction.

Plus tard on a acquis la notion que les citoyens de cet État de cellules ne sont pas toujours en bon rapport entre eux, et qu'au contraire il se manifeste souvent une lutte acharnée entre les cellules, avides d'absorber le plus possible des liquides nutritifs. C'est M. W. Roux qui a surtout introduit dans la science l'idée d'une concurrence vitale entre les éléments d'un organisme. D'après lui, comme des plantes semées en grand nombre et fixées au même endroit, les cellules voisines dans l'organisme se gênent mutuellement et luttent pour leur nutrition : celles qui réussissent à se nourrir le mieux triomphent de leurs concurrentes et donnent naissance à une génération plus vigoureuse, servant ainsi à renforcer l'organisme entier.

Mais ces notions de lutte cellulaire, ainsi que nos connais-

sances sur la relation intime des éléments de l'organisme en général, sont encore bien imparfaites. On sait, il est vrai, déjà depuis longtemps, qu'en dehors de cette concurrence pour la nourriture, les citoyens de l'État cellulaire se dévorent souvent entre eux, et qu'on rencontre couramment des globules rouges mangés par des cellules amiboïdes, qui sont capables aussi de s'incorporer d'autres éléments.

Le côté intime de cette hostilité entre les cellules, réunies dans un organisme, reste cependant encore à élucider. Et comme l'histoire d'un peuple ou d'un État ne peut être comprise sans la connaissance des intrigues entre les individus qui les composent, de même il est impossible de comprendre le fonctionnement de l'« État cellulaire », sans connaître d'une façon précise le mécanisme de la lutte intercellulaire.

Dans le but d'éclaircir autant que possible ce problème, essayons d'établir quelques faits sur le sort des cellules, introduites dans l'organisme lorsqu'il est déjà constitué. Nous abordons ainsi la question de la résorption des cellules, au sujet de laquelle la science possède déjà un certain nombre de données. Mais, quoique on ait réuni quelques faits sur le sort des éléments cellulaires dans l'organisme de certaines espèces animales, les résultats acquis ne présentent pas assez d'intérêt pour justifier un aperçu historique tant soit peu développé.

Il nous sera donc permis, après avoir cité les travaux de MM. *Langhans* [1], *Skrzeczka* [2], de passer à l'exposé de nos propres recherches. En les exécutant, nous nous sommes posé certaines questions générales, notamment celles-ci : comment se fait la résorption des cellules dans les diverses régions de l'organisme? quel rôle y joue la phagocytose? les phagocytes sont-ils capables d'absorber des cellules vivantes? quels changements se produisent dans l'organisme qui a résorbé divers éléments cellulaires?

I

RÉSORPTION DES SPERMATOZOÏDES

Nous commencerons cet exposé par nos observations sur le sort des spermatozoïdes, introduits dans l'organisme animal,

1. *Virchow's Archiv*, t. XLIX, 1870, p. 66.
2. *Ziegler's Beiträge*, t. II, 1888, p. 275.

parce que ce sont ces éléments qui se prêtent le mieux à la solution d'une des questions fondamentales, à savoir : si les cellules peuvent être englobées par des phagocytes à l'état vivant.

Il y a déjà assez longtemps qu'A. *Schneider*[1] a vu qu'un certain nombre de spermatozoïdes de la sangsue médicinale se trouvent souvent englobés par des cellules amiboïdes de ces animaux. Tout récemment M. A. Kowaleswky[2] a démontré que chez l'*Haementaria costata* et plusieurs autres Hirudinés, un grand nombre de spermatozoïdes, entrés dans la cavité générale du corps, deviennent la proie des phagocytes du système rénal, et sont complètement digérés par eux. L'état des spermatozoïdes au moment de leur englobement n'a pu être décelé, à cause de difficultés purement techniques.

Lorsqu'on injecte du liquide séminal de cobaye, renfermant quantité de spermatozoïdes bien mobiles, dans la cavité péritonéale d'autres cobayes, on voit que ces spermatozoïdes conservent pendant quelque temps leur mobilité dans le liquide du péritoine, mais au bout de peu d'heures tous se trouvent logés dans l'intérieur des leucocytes. Englobés par ces cellules, ils ne tardent pas à être digérés, tout comme chez les Hirudinés.

Pour se rendre un compte plus précis de ces phénomènes, il vaut mieux injecter dans la cavité péritoneale des cobayes du sperme en quantité plus abondante, recueilli chez d'autres espèces, le taureau ou même l'homme.

Après avoir introduit dans le péritoine 0,5 à 1 c. c. de ce liquide, on peut s'assurer (en prélevant à l'aide de tubes effilés de petites quantités d'exsudat péritonéal) que les spermatozoïdes se conservent à l'état vivant pendant plusieurs heures. D'abord le sperme provoque une phagolyse plus ou moins marquée, mais de courte durée ; vient bientôt un stade où le liquide péritonéal renferme une grande quantité de leucocytes, dont beaucoup se trouvent remplis de spermatozoïdes. L'englobement débute par la tête, qui se trouve seule dans l'intérieur du protoplasma, tandis que la queue pend librement au dehors (fig. 1). Le protoplasme du leucocyte s'étend bientôt autour de cette queue, ce qui donne lieu à des formes cellulaires assez bizarres (fig. 2). Quelquefois un leucocyte n'englobe qu'un seul spermatozoïde.

1. *Zoologischer Anzeiger*, 1880, p. 19.
2. *Comp. r. de l'Acad. d. Sc*, 1899, 31 juillet, p. 263.

mais souvent il en dévore plusieurs (fig. 3, 4, 7, 9) qu'on trouve dans divers stades de digestion.

En répétant à plusieurs reprises la même expérience, on réussit quelquefois à constater, avec toute la précision désirable, qu'un certain nombre de spermatozoïdes sont englobés à l'état vivant, démontré par la grande mobilité de la queue. Pour faire cette observation, il faut se servir du sperme d'individus jeunes et l'injecter à l'état aussi frais que possible. Il faut observer un spermatozoïde en voie d'englobement, suffisamment éloigné des autres qui pourraient lui communiquer des mouvements purement passifs. En se mettant ainsi dans des meilleures conditions et à l'abri de causes d'erreur possibles, on arrive sans difficulté au résultat que je viens de signaler. Les fig. 5, *a*, *b*, *c*, représentent un spermatozoïde humain, dont la tête se trouve logée dans le protoplasma d'un leucocyte, tandis que la queue, encore libre, manifeste des mouvements des plus vifs. Grâce à ceux-ci, le leucocyte change de position, ce qui permet de s'assurer de la situation incontestablement intracellulaire de la tête du zoosperme.

Après une période de temps variable, la queue est introduite dans le contenu du leucocyte, où on la retrouve tantôt dans une vacuole (fig. 6), tantôt logée directement dans le protoplasma. Elle est digérée la première, de sorte que pendant quelque temps on ne retrouve plus dans l'intérieur des leucocytes que des têtes de spermatozoïdes en voie de dissolution (fig. 7, 8, 9). Après vingt-quatre heures de séjour du sperme dans la cavité péritonéale, les têtes intraleucocytaires deviennent de plus en plus rares et ne tardent pas à disparaître complètement.

Bien que cette résorption des spermatozoïdes se fasse en partie par les microphages (c.-à.-d. leucocytes polynucléaires), leur très grande majorité est englobée et digérée par les leucocytes mononucléaires de cobaye. Je dois signaler ici ce fait général que jamais il ne se produit de digestion des spermatozoïdes dans le liquide de l'exsudat péritonéal. Pendant des heures, certains de ces éléments conservent toute leur mobilité, et il arrive souvent d'observer qu'il reste, au milieu d'une quantité énorme de leucocytes, dont beaucoup ont englobé la presque totalité des spermatozoïdes, quelques rares filaments encore bien mobiles. Bien entendu, il se produit dans l'exsudat péritonéal, tout comme dans le sperme conservé en dehors de l'organisme, une

immobilisation d'un grand nombre de spermatozoïdes, qui marche d'une façon parallèle dans les deux cas.

La résorption des spermatozoïdes dans la cavité péritonéale des cobayes est suivie de la formation dans le liquide du péritoine, ainsi que dans le sérum sanguin de ces animaux, d'une substance qui immobilise les spermatozoïdes. Il se produit donc un « anticorps », comparable à celui qui a été pour la première fois décrit par M. *J. Bordet*[1] vis-à-vis des globules rouges, et qui se trouve dans le sérum sanguin des animaux ayant reçu du sang d'autres espèces. Au commencement de cette année, dans une revue sur l'atrophie sénile[2], j'ai émis l'idée qu'on pouvait obtenir des sérums contre toutes sortes d'éléments cellulaires, et je me suis mis, avec mes élèves, à réaliser cette hypothèse. Indépendamment de moi, M. *Landsteiner*[3] à Vienne a exprimé la même supposition, et a décrit, avant moi, un sérum agissant contre les spermatozoïdes.

Lorsqu'on injecte, dans la cavité péritonéale de cobayes ayant déjà reçu, auparavant, du sperme humain, une certaine quantité (0,5 à 1 c. c.) de ce liquide pour la seconde fois, on constate facilement que les spermatozoïdes s'immobilisent beaucoup plus rapidement que dans le péritoine des témoins. Ce pouvoir immobilisant s'accroît de plus en plus, et se manifeste également dans le sérum sanguin. Alors on peut constater que, introduits dans le sérum du sang des cobayes préparés par plusieurs injections de sperme, les spermatozoïdes s'immobilisent au bout de peu de minutes, tandis qu'ils conservent leur mobilité pendant plusieurs heures dans du sérum sanguin des cobayes neufs.

Mais, même après huit injections de sperme, répétées dans l'espace de cinq mois, le sérum du sang et le liquide péritonéal des cobayes ne fait qu'immobiliser les spermatozoïdes. Il ne se produit ni agglutination, ni dissolution extracellulaire tant soit peu marquée de ces éléments dans les humeurs mentionnées. Les spermatozoïdes immobilisés restent épars et indéfiniment insolubles dans le sérum sanguin, alors que dans la cavité péritonéale ils deviennent la proie rapide des leucocytes qui les digèrent dans leur intérieur.

1. *Ann. de l'Inst. Past.*, 1898, p. 688.
2. *Archives russes de pathologie*, 1899, février.
3. *Centralbl. f. Bacteriologie*, 1899, p. 549.

Mes tentatives pour obtenir une action stimulante des faibles doses de sérum antispermique sur les mouvements des spermatozoïdes n'ont donné jusqu'à présent aucun résultat positif bien net. Même dans des dilutions très faibles (1 volume de sérum pour 80 ou 100 vol. de sperme), le sérum s'est montré immobilisant, quoique tardivement. Et cependant j'ai pu me convaincre de l'existence des sérums stimulants pour les spermatozoïdes. Même le sérum sanguin de cobayes normaux manifeste cette action, comme on le voit en comparant la mobilité des spermatozoïdes, maintenus dans ce sérum et dans leur milieu naturel. Tandis que dans ce dernier ils s'immobilisent tous dans les 12-20 heures, dans le sérum de cobaye ils restent mobiles au delà de 30 heures.

II

RÉSORPTION DES HÉMATIES D'OIE DANS LE PÉRITOINE DE COBAYE

La résorption du sperme nous renseigne bien sur la possibilité pour les phagocytes d'englober les spermatozoïdes à l'état vivant, mais elle ne peut guère servir ni pour la solution du problème du sort définitif de ces éléments, ni pour celui de l'origine des anticorps qui apparaissent dans les humeurs. Il y a ce grand inconvénient que les têtes des spermatozoïdes, pendant la digestion intracellulaire, se transforment vite en des masses peu caractéristiques, impossibles à distinguer d'autres granulations analogues. Sous ce rapport les spermatozoïdes présentent les mêmes inconvénients que les microbes, injectés dans un organisme résistant : on les perd bientôt de vue, ce qui rend particulièrement difficile l'étude de leur sort dans l'organisme qui produit les anticorps. Les globules rouges du sang des vertébrés inférieurs, munis de noyau, se prêtent au contraire beaucoup mieux à ce genre de recherches. Voilà pourquoi je me suis mis depuis plus d'un an à étudier la résorption des hématies dans l'organisme du cobaye. J'ai choisi les globules rouges de l'oie à la suite d'une observation qui mérite d'être mentionnée. En juin 1898, je fis des recherches sur le sort des spirilles de la septicémie des oies, dans le péritoine du cobaye, espèce réfractaire à ce microbe. Je pus facilement constater que les spirilles que l'on injecte (faute de pouvoir les cul-

tiver) avec du sang d'oie, restent vivants et bien mobiles pendant plusieurs heures, après quoi ils sont dévorés par les leucocytes. J'ai pu souvent observer l'englobement des spirilles très mobiles par ces cellules, et fournir ainsi une fois de plus la preuve que la phagocytose peut s'exercer vis-à-vis des bactéries vivantes. Mais, lorsque je répétais plusieurs fois l'injection du sang, renfermant des spirilles, dans le péritoine d'un même cobaye, j'observais que ces microbes finissaient par s'immobiliser et se dissoudre en partie en dehors des leucocytes. Seulement, parallèlement avec cette destruction extracellulaire des spirilles, j'ai pu constater le même phénomène sur les globules rouges. Comme J. Bordet étudiait en même temps, dans mon laboratoire, l'agglutination des hématies sous l'influence des sérums, il fit un travail très intéressant sur l'ensemble des phénomènes hémolytiques, à la suite des injections répétées de sang. Il a pu approfondir l'étude de cette question, en démontrant l'existence de deux substances qui concourent à la dissolution des globules rouges, et a établi une analogie des plus étroites entre ce phénomène et la bactériolyse.

Bientôt après M. J. Bordet, M. Ehrlich[1], en collaboration avec M. Morgenroth, publia sur l'hemolyse deux travaux remarquables qui furent suivis de plusieurs autres publications sur cette question (*Dungern*[2], *Landsteiner*[3]).

En passant à nos propres recherches, voyons d'abord ce qui se produit dans le péritoine de cobayes, auxquels on injecte une certaine quantité (0,5 à 7 c. c.) de sang défibriné d'oie. Après une courte période de phagolyse, les leucocytes affluent dans le liquide péritonéal, et commencent bientôt à englober les hématies. Ce processus se fait d'une façon très particulière, et mérite à un haut point notre attention. Les mononucléaires poussent des prolongements protoplasmiques nombreux et très fins, à l'aide desquels ils accrochent une ou plusieurs hématies à la fois (fig. 10, 12, 20, 21). A la suite de ce phénomène, il se produit une adhérence intime entre les macrophages de l'exsudat et les hématies qui présentent un aspect bizarre. En examinant avec un faible grossissement, on trouve dans la goutte de l'exsudat des grumeaux qu'on serait tenté de prendre d'abord

1. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 1899.
2. *Münchener medic. Wochenschr.*, 1899, NN. 13 et 14.
3. *L. c.*

pour une vraie agglutination. Mais l'observation plus précise démontre aussitôt la fausseté de cette interprétation, et nous apprend qu'il s'agit ici d'amas de leucocytes mononucléaires, qui sont accolés à une quantité d'hématies (fig. 14). Dans cet état, les deux espèces de globules peuvent persister assez longtemps, et ce n'est que plus tard que les macrophages finissent par englober les hématies entières dans leur protoplasma. Cet acte ressemble beaucoup plus à la façon dont les Vampyrelles s'incorporent le contenu des algues qu'à l'absorption de la nourriture par les amibes.

Aussitôt englobées, les hématies subissent dans l'intérieur des mononucléaires les premiers effets d'une action digestive. Pour la rendre manifeste, ajoutons à une goutte suspendue de l'exsudat péritonéal une trace de solution aqueuse de bleu de méthylène. Quelques minutes après, nous constaterons ce fait général que les noyaux de toutes les hématies englobées fixeront le bleu, tandis que tous les noyaux des hématies accolées à la surface des macrophages resteront incolores. Ce dernier fait, d'une constance absolue, nous montre que la phagocytose s'accomplit sur des hématies vivantes, ce qui confirme le résultat principal que nous avait fourni l'étude de la résorption des spermatozoïdes.

Les macrophages s'accolent, à l'aide de leurs pseudopodes, des hématies vivantes, les introduisent dans leur protoplasma et les tuent. Les altérations digestives que subissent les globules rouges sont assez variables. Les hématies englobées, souvent en grande quantité, restent éparses dans le contenu cellulaire, ou bien se réunissent en amas plus ou moins volumineux et colorés d'un jaune orange intense (fig. 15). L'hémoglobine passe du contenu de l'hématie dans le noyau et le colore en jaune (fig. 13); d'un autre côté, elle diffuse dans le protoplasma même et lui communique une teinte citrine. On peut s'assurer de cette dissolution de l'hémoglobine en comparant les diverses gouttes de l'exsudat, fraîchement extraites: mais on peut la constater aussi en étudiant au microscope les changements que subissent les hématies dévorées dans des gouttes suspendues de l'exsudat péritonéal. Ainsi, dans un macrophage vivant que j'ai reproduit sur la fig. 15 *a*, on voit, à côté des hématies ratatinées, deux gros amas, composés par plusieurs globules rouges intimement réunis. Le

protoplasma du macrophage était à ce moment absolument incolore. Quinze minutes plus tard, l'hémoglobine s'est échappée des hématies agglomérées dans le protoplasma du mononucléaire (fig. 15, *b*, *c*). Les corps des globules rouges se sont presque vidés, tandis que leurs noyaux se sont conservés sous forme de corps ovales, colorés en jaune. Cette diffusion de l'hémoglobine démontre que le stroma du globule rouge est attaqué par le processus digestif, fait confirmé par la dissolution consécutive du corps de l'hématie. Au bout d'un temps plus ou moins long, de tout le globule rouge il ne reste plus dans l'intérieur du mononucléaire que des noyaux ou leurs debris, colorés par l'hémoglobine (fig. 22). La digestion de ces noyaux se fait avec une grande lenteur, mais elle est définitive et aboutit à leur disparition complète [1].

Mais, à côté de ce processus régulier, il se produit dans quelques macrophages un second mode de digestion des hématies qui présente pour nous un intérêt particulier. Dans ce cas, le noyau se dissout le premier; il ne fixe pas l'hémoglobine, mais celle-ci colore le corps de l'hématie qui reste pendant longtemps sans se dissoudre (fig. 13 et 14). Je suppose que les substances du noyau ont pénétré dans le corps du globule, et que ce sont elles qui résistent pendant si longtemps à l'action digestive du macrophage. Les hématies qui présentent ces particularités sont très caractéristiques par leur forme et leur coloration, et, se conservant pendant de longues journées dans l'intérieur des macrophages, elles peuvent nous servir de témoin précieux et sûr de leur présence dans les divers endroits de l'organisme. C'est à l'aide de ces hématies particulières que nous tâcherons de nous rendre compte de l'origine des anticorps hémolytiques.

Les processus, tels que je viens de les décrire, se passent dans l'exsudat péritonéal, et peuvent être observés pendant quelques jours après l'injection du sang d'oie dans le péritoine. Ce sont presque exclusivement les macrophages qui englobent et digèrent les hématies. Les leucocytes polynucléaires ne prennent qu'une part insignifiante à cette résorption. Quant à la dissolution extracellulaire des hématies dans le liquide péritonéal, elle est abso-

1. La digestion des hématies d'oie dans l'intérieur des cellules épithéliales de l'intestin des planaires, par conséquent la vraie digestion intracellulaire, accuse une analogie frappante avec les changements qui s'observent dans les macrophages de cobaye.

lument nulle. Après des injections de grandes quantités de sang (7 c. c.), un nombre considérable des hématies restent libres pendant deux ou trois jours, et cependant il ne s'en dissout pas une seule dans le liquide du péritoine : toutes sont plus ou moins vite englobées par les leucocytes et dissoutes dans leur intérieur. Ce résultat, confirmé à maintes reprises et absolument constant, se trouve en désaccord complet avec l'affirmation de M. *Dungern*, qui pense que les globules rouges, injectés dans le péritoine des cobayes, ne se dissolvent que dans l'humeur de l'exsudat. Comme ce savant s'est servi de sang de poule et de pigeon, j'ai eu soin de répéter quelques expériences avec des hématies de même provenance. Eh bien, j'ai pu m'assurer de la façon la plus précise que dans ces cas aussi (ce qui était, du reste, facile à prévoir), les choses se passent de même qu'avec le sang d'oie, c'est-à-dire que les hématies sont digérées non pas dans le liquide de l'exsudat, mais exclusivement dans l'intérieur des leucocytes, et notamment des mononucléaires. Je n'ai donc pas besoin de revenir sur ce point.

Quelques (3, 4) jours après l'injection du sang, les leucocytes, chargés d'hématies ou de leurs débris, disparaissent du liquide péritonéal. Des tubes effilés, introduits dans la cavité péritonéale, ne ramènent qu'un liquide incolore et louche, renfermant quantité de leucocytes vides et principalement des petits lymphocytes.

Pour se renseigner sur le sort des hématies injectées, il faut donc les chercher ailleurs, et pour cela faire l'autopsie des animaux. L'épiploon présente à ce moment une coloration de rouille, qui provient de la grande quantité de globules rouges d'oie et de leurs débris, logés dans l'intérieur de très nombreux macrophages. Ceux-ci sont disséminés ou bien réunis en petits ganglions. L'examen détaillé, sur des frottis ou des coupes (fig. 16), de ces gros mononucléaires révèle la présence de nombreux grains, colorés en jaune orange, parmi lesquels on rencontre souvent les hématies d'oie (fig. 16, *a*), présentant cette forme si caractéristique que j'ai décrite plus haut.

Les ganglions mésentériques constituent un second endroit de refuge des macrophages, bourrés d'hématies en voie de digestion. Ici encore la forme typique des globules rouges en « tonneau » nous renseigne d'une façon absolument précise.

Mais, en dehors du système lymphatique, les macrophages,

ayant dévoré des hématies d'oie, se dirigent vers la rate et le foie. Dans le premier de ces deux organes, leur recherche est plus difficile que dans l'épiploon et les ganglions du mésentère, à cause de la grande quantité de macrophages, remplis de débris de globules rouges de cobaye. Et cependant, à l'aide de la forme « tonneau » qui nous guide, on constate sûrement leur présence dans la rate. Je dois dire toutefois que le nombre de mononucléaires renfermant des débris d'hématies d'oie dans la rate est beaucoup plus faible que dans les organes lymphatiques.

Dans le foie, la recherche de ces mononucléaires est chose facile. Sur des frottis, comme sur des coupes, on en trouve un nombre assez considérable. Ces macrophages, logés dans les vaisseaux du foie (fig. 17), se distinguent de suite des cellules hépatiques voisines, et la fréquence des globules rouges en forme de tonneau ne laisse aucun doute sur leur nature.

Nous voyons donc qu'après leur disparition de la cavité péritonéale, les leucocytes, bourrés d'hématies d'oie, passent dans le système lymphatique, et de là pénètrent dans les vaisseaux sanguins. On les retrouve non seulement dans les capillaires et les tout petits vaisseaux du foie, mais on constate leur présence aussi dans les gros vaisseaux du système porte (fig. 18) et de la veine hépatique. Ces faits indiquent déjà que les mononucléaires, renfermant des débris de globules rouges d'oie, passent dans la circulation. On les retrouve en effet dans la veine cave inférieure (fig. 19) et même dans le sang du cœur. Seulement ici leur présence est plus difficile à constater, ce qui se conçoit aisément. Ce sont toujours les hématies en forme de tonneau qui nous garantissent la réalité des faits signalés. Les cellules qui les renferment sont très rares: plus fréquents sont les mononucléaires ayant dans leur intérieur des granulations, colorées en jaune, parmi lesquelles on reconnaît les restes des noyaux de globules rouges d'oie.

En prévision du grand intérêt que devait présenter l'étude de la dissémination des corpuscules étrangers dans l'organisme, j'ai engagé un de mes élèves, M. *Ricoux*, à rechercher le sort de grains de carmin, injectés en divers endroits de l'animal. M. *Ricoux* a très minutieusement étudié cette question[1] et est arrivé à un résultat tout à fait contraire à ma supposition. Après

1. Contribution à l'étude du problème de l'inflammation, *Thèse*, Paris, 1898.

avoir injecté la poudre de carmin dans la cavité péritonéale de cobayes, il n'a jamais pu la retrouver ailleurs que dans les cellules phagocytaires du péritoine.

Il existe donc une grande différence dans le sort du carmin et des hématies d'oie, injectés dans la cavité péritonéale : à savoir que le premier reste localisé, tandis que les secondes passent dans la circulation et se généralisent. Cette différence tient peut-être à ceci que le carmin reste insoluble pendant un temps très long, peut-être même indéfini, tandis que les hématies finissent sûrement par être complètement digérées dans les macrophages.

III

LES ANTICORPS DE COBAYE VIS-A-VIS DES HÉMATIES D'OIE

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre précédent, la résorption des hématies d'oie dans le péritoine du cobaye amène comme conséquence l'apparition de substances hémolytiques dans le liquide péritonéal. Comme il a été démontré d'abord par M. J. Bordet, il se produit dans ces conditions une substance qui agglutine les hématies, une autre qui les dissout (Alexine de Bordet ou *Addiment* de M. Ehrlich) et une troisième (substance sensibilisatrice de Bordet, ou corps immunisant d'Ehrlich) qui favorise l'action de la précédente ; MM. Ehrlich et Morgenroth ont fait des recherches très importantes et très ingénieuses sur cette question, et ont donné le mécanisme de l'action de ces diverses substances. On les retrouve non seulement dans le liquide péritonéal, mais également et en grande partie dans le sérum sanguin.

Les substances hémolytiques sont beaucoup plus développées que la substance antispermique que nous avons mentionnée dans notre premier chapitre. Elles apparaissent dans les humeurs des cobayes qui ont reçu une ou plusieurs injections de sang d'oie dans le péritoine, et ne sont que très faiblement représentées dans les liquides de cobayes neufs, non traités par le même sang. L'addition aux hématies d'oie de sérum sanguin ou du liquide de la lymphe péritonéale de cobaye normal n'amène pas la dissolution des globules rouges, même lorsque l'on ajoute vingt fois plus de liquide que de sang d'oie (20 : 1). Par contre

même dans des dilutions plus étendues (5 : 1), on observe une agglutination plus ou moins prononcée. Cette propriété agglutinative normale est développée au même degré ou à peu près dans le sérum du sang et de la lymphe péritonéale de cobayes neufs. Après l'injection d'une grande quantité de sang d'oie défibriné dans le péritoine de cobayes, 7 c. c. injectés d'emblée, leurs humeurs acquièrent la propriété d'agglutiner plus fortement les hématies d'oie et aussi de les dissoudre. C'est d'abord la substance agglutinative qui apparaît la première dans l'exsudat péritonéal. Déjà 48 heures après l'injection, ce liquide agglutine dans la proportion de 3 : 1 et de 1 : 1, tandis que le sérum sanguin chez le même cobaye n'agglutinait même pas à 5 : 1. D'une étude comparée dans toute une série d'expériences, il résulte que la propriété agglutinative se manifeste d'abord dans le liquide de l'exsudat péritonéal, et n'apparaît que plus tard (vers le sixième jour) dans le sérum du sang. Dans une période plus avancée, après la disparition de l'exsudat péritonéal, la lymphe du péritoine devient notablement moins agglutinative que le sérum sanguin. Ainsi chez un cobaye, examiné 30 jours après l'injection de 7 c. c. de sang d'oie dans la cavité abdominale, le sérum du sang agglutinait bien à 1 : 1, tandis que le liquide de la lymphe péritonéale ne le faisait qu'à partir de 3 : 1.

La propriété hémolytique n'apparaît point dans l'exsudat péritonéal provoqué par l'injection du sang. Cet exsudat disparaît le plus souvent le quatrième jour après l'injection, et bientôt après le sérum du sang devient hémolytique. C'est à partir du sixième jour que ce sérum commence à dissoudre les hématies d'oie en proportion de 10 : 1. Cette propriété s'accroît notablement les jours suivants, de sorte que du treizième au dix-septième jour elle devient active en mélange de 3 : 1 et de 1 : 1. Plus tard, les pouvoirs agglutinatif et hémolytique du sérum sanguin s'accusent encore davantage, et se maintiennent à peu près pendant trois mois, après quoi la propriété dissolvante diminue peu à peu et disparaît complètement, tandis que le pouvoir agglutinatif persiste encore pendant un certain temps. Apparue la première, la substance agglutinative s'épuise la dernière.

De toutes les humeurs des cobayes ayant reçu des injections péritonéales de sang d'oie, c'est le sérum sanguin qui manifeste

le plus fort pouvoir hémolytique. Le sérum de la lymphe péritonéale, extraite à la période où le sérum sanguin est déjà manifestement hémolytique (c'est-à-dire quelques jours après la disparition de l'exsudat péritonéal, provoqué par l'injection du sang), ne dissout les hématies d'oie que d'une façon très faible. Plus tard, lorsque le pouvoir dissolvant de la lymphe péritonéale augmente, il reste néanmoins toujours sensiblement inférieur à la propriété hémolytique du sérum sanguin. Le liquide du péricarde agit encore plus faiblement. Il en est de même du liquide de l'œdème, provoqué par l'arrêt de la circulation. Cette humeur agglutine bien les hématies d'oie, mais ne les dissout que dans un faible degré. Ainsi, dans une expérience, le sérum sanguin, en proportion de 1 : 1, dissolvait la majorité des hématies, tandis que le liquide de l'œdème du même animal, en quantité double (2 : 1), ne produisait que des traces de dissolution.

Les propriétés humorales que je viens de décrire proviennent-elles de quelque organe ou tissu spécial? Il est incontestable que les anticorps doivent être produits dans l'organisme par certains éléments cellulaires. Dans l'intention d'éclaircir ce problème, j'ai sacrifié une série de cobayes, et j'ai cherché dans leurs organes des anticorps hémolytiques en général, et les substances qui dissolvent les hématies en particulier.

Mais, avant de m'adresser aux animaux qui ont reçu des injections de sang d'oie, j'ai dû d'abord me rendre compte de la propriété hémolytique vis-à-vis de ce sang chez des cobayes neufs. Dans ce but, je préparais des émulsions de divers organes finement broyés, avec la solution physiologique de NaCl, et j'ajoutais à des volumes déterminés de ces liquides du sang d'oie défibriné, en diverses proportions. Les résultats ont été très précis. De tous les organes examinés, c'était d'abord l'épiploon, puis les ganglions mésentériques, et en dernier lieu la rate, qui manifestaient vis-à-vis des hématies d'oie une action hémolytique très marquée, comme on peut s'en rendre compte en jetant un coup d'œil sur l'appendice I. Au contraire, ni le foie, ni la moelle des os ne se montraient jamais capables de dissoudre même la moindre quantité de globules rouges d'oie, tandis que l'épiploon était fortement hémolytique, souvent même en proportion de 1 : 1. Le chauffage à 56°, pendant 45′ ou une heure,

faisait complètement disparaître la propriété hémolytique des organes cités, ce qui rapproche la ou les substances qui digèrent les hématies des « alexines » ou « addiments », observés dans le sang des animaux ayant reçu des injections préalables de sang.

Les organes hémolytiques des cobayes normaux ont entre eux ceci de commun qu'ils renferment tous une quantité de macrophages. La rate et les ganglions lymphatiques, au système desquels se rapporte le tissu de l'épiploon, sont les foyers principaux de la production des phagocytes mononucléaires. On arrive donc à cette conclusion que dans le cobaye normal il n'y a que les macrophages qui renferment des substances hémolytiques. Ce résultat est confirmé par l'absence de cette action hémolytique dans la moelle des os, qui, comme cela a été surtout démontré par les recherches mémorables de M. Ehrlich, est la source principale des leucocytes polynucléaires et éosinophiles. D'un autre côté, il se trouve en harmonie avec le fait bien connu que les globules rouges sont très fréquemment absorbés par les mononucléaires de la rate et des ganglions lymphatiques du même animal.

L'examen des organes de cobayes, ayant reçu des injections intrapéritonéales de sang d'oie, nous montre que ce sont encore les mêmes foyers des macrophages (épiploon, ganglions mésentériques, rate) qui manifestent une action hémolytique très prononcée vis-à-vis des hématies d'oie. Seulement, lorsque l'on compare le degré de cette action chez ces animaux avec l'effet des mêmes organes des cobayes neufs, on trouve exactement les mêmes proportions (v. l'appendice II). Le temps qui est nécessaire pour que la dissolution se fasse dans l'émulsion des organes macrophagiques des cobayes traités par le sang et des témoins neufs est sensiblement le même : souvent il faut plus de 24 heures pour que l'action hémolytique se manifeste d'une façon suffisante. A-t-on le droit de conclure de ces faits que les foyers des mononucléaires, bien que renfermant à l'état normal des substances hémolytiques, soient incapables d'en fournir davantage après une injection de sang d'oie ?

Si l'on tient compte de ceci, que la digestion définitive des hématies demande un temps assez long (on trouve des restes bien nets de ces globules dans l'intérieur des mononucléaires

2 à 3 semaines après l'injection), et qu'un grand nombre de macrophages des organes sont bourrés d'hématies englobées, on admettra facilement que celles-ci peuvent fixer une quantité de substances hémolytiques abandonnées, dans les émulsions décrites. par les macrophages arrivés à la fin de leur digestion. Je dois rappeler ici le fait si important, découvert par MM. Ehrlich et Morgenroth, que leur « substance immunisante », celle qui est nécessaire pour que l'action digestive de « l'addiment » se manifeste, est rapidement fixée par les globules rouges.

Dans tous les cas, nous avons droit d'attirer l'attention du lecteur sur ce fait fondamental, que les seuls organes qui accusent une action hémolytique sont précisément les foyers des macrophages, c'est-à-dire des cellules qui jouent le rôle presque exclusif dans la résorption des hématies. De là on est forcé de conclure que les substances hémolytiques des humeurs doivent leur origine aux phagocytes mononucléaires. Tant que ces cellules sont en train de digérer les hématies, ces substances restent fixées aux globules rouges et à leurs débris. A la fin de la digestion intracellulaire, une partie des « ferments » hémolytiques des macrophages passent dans le sang, et s'y retrouvent sous forme de substances, étudiées par M. J. Bordet et les autres savants.

Après la digestion des hématies, les macrophages diminuent de volume, ce que l'on peut constater par l'observation directe, et ce qui démontre qu'ils ont dû céder à leur entourage, excréter quelque chose. Je suppose que ces *excreta* doivent renfermer les substances hémolytiques que l'on retrouve dans les humeurs. Pour vérifier cette théorie, comparons d'abord l'hémolyse, produite par les humeurs, avec celle que nous avons décrite dans l'intérieur des macrophages. Au premier abord, on pourrait croire à une différence essentielle. Sous l'influence du sérum hémolytique, les hématies d'oie s'arrondissent, leur coloration devient de plus en plus pâle, et finalement elles se transforment en vésicules incolores, renfermant le noyau intact et également incolore. L'hémoglobine s'échappe des hématies et colore le liquide qui les baigne. Dans l'intérieur des macrophages nous voyons, au contraire, la coloration par l'hémoglobine persister longtemps, surtout dans le noyau des hématies et dans ses débris. Cette différence s'explique cependant très facilement par

le fait que, dans les humeurs, les hématies, à peine attaquées, cèdent de suite leur hémoglobine, tandis que, dans les macrophages vivants, elles restent plus longtemps dans l'intérieur de la cellule, empêchées de sortir par le protoplasma. D'un autre côté, le noyau de l'hématie dans les humeurs hémolytiques reste intact et, comme tel, ne fixe pas l'hémoglobine, tandis que dans les macrophages le noyau de l'hématie est aussitôt attaqué, et ne peut empêcher la pénétration de l'hémoglobine dans sa masse. L'interprétation que je donne est confirmée par l'observation des changements que subissent les hématies englobées dans les macrophages qu'on laisse mourir en dehors de l'organisme. Si on retire une goutte d'exsudat péritonéal au moment où beaucoup d'hématies d'oie viennent d'être englobées par les mononucléaires, et si on la maintient en dehors de l'organisme, on verra au bout de quelques heures des macrophages remplis d'hématies ayant bien conservé leur forme normale, mais complètement incolores. En poursuivant cette observation, on peut constater que le protoplasma mort n'empêche plus la sortie de l'hémoglobine, et la laisse échapper dans le liquide ambiant, tout à fait comme dans l'hémolyse qui se produit dans les humeurs.

Il n'y a donc qu'une seule différence réelle entre l'hémolyse dans les macrophages et dans les humeurs, c'est que dans le premier cas le noyau est digéré, tandis que dans le second il ne l'est pas. Ce fait nous amène à conclure que les ferments hémolytiques des humeurs sont moins actifs que ceux des macrophages. Ce résultat s'accorde bien avec l'idée que la substance dissolvante du sérum représente une partie de ferments intracellulaires, excrétée par les macrophages à la fin de la digestion des hématies. Comme c'est dans le sang que ces phagocytes se dirigent dans la période terminale de la digestion, il est bien naturel que la substance hémolytique excrétée se retrouve également dans ce même milieu, comme le démontrent les faits que j'ai établis.

M. Dungern s'est déjà demandé si la substance hémolytique du sang n'était pas d'origine leucocytaire. Pour résoudre cette question il a entrepris quelques expériences, dont le résultat a été interprété par lui dans un sens absolument négatif. Voici comment il a procédé. En injectant dans le péritoine des cobayes, ayant préalablement reçu du sang de pigeon, des substances

qui provoquent la leucocytose, il retirait l'exsudat péritonéal, très riche en leucocytes, et comparait son action hémolytique avec celle du sérum sanguin des mêmes animaux. On constatait que le sang, beaucoup moins riche en globules blancs, était plus hémolytique que l'exsudat péritonéal; M. Dungern a conclu que les leucocytes n'étaient pour rien dans la production des anticorps hémolytiques. Un des principaux défauts de ces expériences consiste en ceci, que tous les leucocytes sont envisagés en bloc, comme cela se fait encore si souvent dans les recherches de ce genre. Or, les leucocytes qui excrètent les anticorps hémolytiques sont des mononucléaires, ayant dévoré et digéré des hématies, tandis que les leucocytes appelés dans le péritoine après des injections de substances chimio-tactiques, sont pour la plupart des polynucléaires. Il est tout naturel que ceux-ci ne puissent contribuer à la production des anticorps, car ils n'ont rien à faire avec la résorption des hématies. La conclusion de M. Dungern ne peut donc nullement être acceptée.

On pourrait croire que la solution expérimentale précise de la question qui nous préoccupe devrait être fournie par la comparaison de la propriété hémolytique du plasma sanguin et de la couche du sang turbiné, renfermant la grande majorité des leucocytes. Mais cette méthode directe est sujette aux mêmes difficultés que celles que nous avons signalées à propos des organes à macrophages. Dans le sang, on trouvera réunis des mononucléaires, ayant terminé la digestion des hématies et capables d'excréter le surplus des substances hémolytiques, avec des macrophages encore bourrés de débris de globules rouges. Ces débris, échappés du contenu des phagocytes par la macération, devront fixer une partie des anticorps dissous dans le liquide, et par conséquent diminueront le titre hémolytique de celui-ci. Le résultat général sera donc troublé par une cause purement artificielle.

Quoiqu'il soit tout naturel d'admettre que les cellules qui ont la fonction d'absorber et de digérer les hématies sont capables d'excréter des substances hémolytiques, il serait néanmoins très important d'appuyer cette conclusion par des faits bien établis. La preuve directe manquant à cause des difficultés que je viens de signaler, il y aurait lieu de chercher des arguments ailleurs.

Nous devons rappeler ce fait constant que la résorption des hématies d'oie dans le péritoine des cobayes se fait exclusivement par des phagocytes, et presque uniquement par des mononucléaires. Après l'injection de fortes quantités de sang, il arrive qu'une partie des hématies reste libre pendant trois et quelquefois même quatre jours. Malgré cela il ne se produit aucune trace de dissolution, même partielle, de ces globules dans le liquide de l'exsudat. Cette période de trois ou quatre jours n'a donc pas suffi pour réveiller une action dissolvante autre que celle qui est exercée dans l'intérieur des phagocytes. On pourrait croire, à la suite de cette constatation, que chez le cobaye il est en général impossible d'obtenir une digestion extracellulaire des hématies d'oie. Cette conclusion serait cependant erronée. Lorsque l'on injecte, non pas dans le péritoine, mais dans le tissu sous-cutané de cobaye, la même quantité (7 c. c.) de sang défibriné d'oie, on observe des phénomènes particuliers. Les hématies restent longtemps libres, plongées dans le liquide de l'œdème, mélangé avec le sérum sanguin d'oie, et une partie seulement des globules rouges devient tardivement la proie des leucocytes. Un assez grand nombre d'hématies se dissolvent en partie (c'est-à-dire sauf le noyau) dans le liquide même qui se colore en rose plus ou moins foncé. L'explication de cette différence avec la résorption dans le péritoine n'est point difficile. Tandis que dans ce dernier endroit le sérum sanguin d'oie s'absorbe vite, et que les macrophages, se trouvant toujours en grande proportion dans la lymphe péritonéale, peuvent bientôt commencer la résorption, dans le tissu sous-cutané le sérum injecté persiste plus longtemps, et les macrophages n'arrivent que tardivement. A la suite de l'injection du sang d'oie, il se produit une réaction locale, qui se manifeste par une accumulation d'un liquide clair et la pénétration d'une quantité de leucocytes polynucléaires, qui, ici, accusent aussi peu de tendance à dévorer les hématies que dans le péritoine.

Grâce à ce concours de circonstances, les hématies libres subissent une action dissolvante du mélange du sérum d'oie et du liquide de l'œdème. Si on prépare le mélange de ces deux humeurs *in vitro*, et si on y ajoute un peu d'hématies d'oie, on constate facilement la dissolution de l'hémoglobine et la coloration rose du liquide.

Les macrophages arrivent, quoique tardivement, dans l'exsudat sous-cutané et s'emparent des hématies non dissoutes dans les humeurs.

Nous avons donc chez le cobaye deux modes de résorption des hématies d'oie. La résorption exclusivement phagocytaire dans le péritoine, et la résorption mixte (en partie seulement par les phagocytes, en partie par la dissolution humorale) dans le tissu sous cutané. Si, dans la production des anticorps hémolytiques, il s'agit de cellules autres que les phagocytes, il faut croire que, dans le cas où une partie des hématies est soustraite à l'action phagocytaire et dissoute directement par les humeurs, il y aura un rendement plus fort d'anticorps. Au contraire, si ce sont les macrophages qui eux-mêmes produisent les substances hémolytiques, on en trouvera une plus grande quantité à la suite de l'injection intrapéritonéale du sang d'oie, où la résorption se fait exclusivement par les phagocytes.

Pour répondre à cette question, j'ai comparé le pouvoir hémolytique du sérum sanguin de cobayes, dont les uns ont reçu 7 c. c. de sang d'oie sous la peau, et les autres la même quantité dans le péritoine. La comparaison s'étend à une période de temps entre le quatrième jour et trois mois et demi après l'injection. Le résultat (v. les appendices II et III) a été des plus nets. Dans tous les cas, sans exception, le sérum sanguin des cobayes, qui ont reçu le sang d'oie dans le péritoine, a été manifestement plus hémolytique que le sérum des cobayes, auxquels j'avais injecté ce sang dans le tissu sous cutané. Les phagocytes, et spécialement les macrophages, doivent donc réellement jouer un rôle considérable dans la production des anticorps hémolytiques des humeurs.

Ce résultat se trouve en harmonie avec une autre série d'expériences. On sait, d'après les recherches de M. J. Bordet, que l'injection, dans le péritoine du cobaye, du sang de cette même espèce, n'amène pas l'apparition de la propriété hémolytique des humeurs. Eh bien ! comment se fait la résorption des hématies de cobaye dans ce cas ? L'observation nous montre qu'une partie insignifiante de ces globules est dévorée par les leucocytes, tandis que la plus grande majorité est résorbée directement par le système lymphatique. Pendant plusieurs jours on assiste à ce spectacle d'un exsudat péritonéal, contenant

beaucoup de leucocytes qui ne renferment pas de globules rouges, et une masse de ces hématies, absolument intactes, qui ne disparaissent que très lentement et sans subir la moindre dissolution.

IV

RÉSORPTION DES HÉMATIES D'OIE DANS L'ORGANISME DE COBAYES POSSÉDANT LES ANTICORPS DANS LEURS HUMEURS

Dans les deux chapitres qui précèdent, nous avons tâché d'éclaircir les phénomènes de la résorption des hématies et leur sort dans l'organisme, ainsi que l'apparition et l'origine des anticorps hémolytiques des humeurs.

Essayons maintenant de nous rendre compte des phénomènes de résorption des hématies d'oie, injectées dans le péritoine de cobayes dont les humeurs possèdent déjà ces anticorps, développés à la suite d'injections antérieures du sang de même volatile.

Comme on le sait par la première publication de M. Bordet, dans ce cas les hématies, ou au moins la plupart de ces globules, sont agglutinées et dissoutes dans le liquide péritonéal, ce qui présente une grande analogie avec le « phénomène de Pfeiffer » qui s'observe vis-à-vis du vibrion cholérique. Seulement les hématies d'oie ne se dissolvent qu'en partie : la membrane et le noyau se conservent pendant un temps plus ou moins long, et finissent par être englobés et digérés dans l'intérieur des phagocytes. Le rôle de ces derniers semble donc bien être, dans le cas qui nous intéresse, tout à fait secondaire, comme cela a été tant de fois affirmé comme principe de l'action phagocytaire en général.

Presque aussitôt après l'injection du sang d'oie dans le péritoine de cobayes préparés, les hématies se réunissent en grumeaux plus ou moins grands, en partie visibles déjà à l'œil nu. Cette dernière circonstance nous permet de constater facilement que l'agglutination se produit dans le liquide péritonéal même, sans avoir besoin du concours de facteurs intervenant après l'extraction de l'exsudat. En effet, lorsqu'on retire avec des tubes effilés un peu de ce liquide, on remarque facilement qu'il sort rempli de grumeaux rouges, constitués par

des amas d'hématies. On confirme le même fait si on injecte, dans le péritoine, du sang d'oie préalablement saturé d'acide carbonique et presque noir. Il n'est pas besoin du contact de l'oxygène pour mettre en action la substance agglutinante, dissoute dans le liquide de l'exsudat. Dans ce même liquide se produit également la dissolution d'un grand nombre de globules rouges, moins la membrane et le noyau. Seulement, comme dans ce phénomène agissent très probablement les deux substances, signalées d'abord par M. J. Bordet et étudiées, ensuite, par MM. Ehrlich et Morgenroth avec un si grand soin, il y a lieu de se demander si toutes deux elles se trouvent préformées dans le liquide péritonéal. Comme les injections du sang d'oie dans le péritoine de cobayes amènent chaque fois une phagolyse plus ou moins considérable (il est probable que le sérum d'oie exerce une forte action phagolytique sur les leucocytes de cobaye), il se pourrait bien qu'une partie des substances hémolytiques soit dégagée des phagocytes touchés par le liquide injecté. Si on prépare le péritoine de cobayes par des injections préalables de bouillon ou d'eau physiologique, on supprime jusqu'à un certain point la dissolution extracellulaire de globules rouges d'oie, mais on n'amène pas la phagocytose totale et précoce aussi prononcée que dans le cas du vibrion cholérique. Un résultat plus complet peut être obtenu par un autre procédé. M. Besredka a démontré (dans un travail inédit) que l'acide carbonique amène une très forte leucocytose chez divers animaux. Guidé par cette découverte, j'injectais dans le péritoine de cobayes, dont les humeurs étaient très hémolytiques, du sang d'oie, préalablement saturé de CO^2. Dans ces conditions, malgré l'agglutination des hématies qui se produit très rapidement, la dissolution de ces globules dans le liquide ne se fait presque pas. Il se produit bien une digestion extra-cellulaire de quelques hématies, mais elle est tout à fait insignifiante en comparaison avec la phagocytose très précoce et extrêmement développée que l'on observe dans l'exsudat péritonéal. Déjà trois minutes après une injection d'un c. c. de sang d'oie dans le péritoine d'un cobaye, préparé pendant deux semaines par quatre injections du même liquide, on trouve (fig. 20) un grand nombre de macrophages chargés de globules rouges d'oie, ayant conservé leur hémoglobine. La quantité des hématies incolores (c'est-à-dire

ayant perdu leur matière colorante par l'action humorale) qu'on retrouve dans les premiers moments (fig. 20, a), diminue notablement avec le temps, de sorte que, deux heures après l'injection de sang d'oie, la grande majorité des globules rouges, englobés par les leucocytes, ou nageant dans le liquide, sont parfaitement colorés par l'hémoglobine. (Fig. 21.) En un mot, la dissolution extracellulaire dans les conditions mentionnées est réduite au minimum, tandis que la phagocytose devient tout à fait prédominante. Il est à remarquer que les macrophages, qui dans ces cas englobent les hématies avec une si grande rapidité, les saisissent le plus souvent comme de vrais amibes, c'est-à-dire en entourant leur proie par leur masse protoplasmique (fig. 20, b), et ne se l'incorporent que rarement (fig. 20, c) par le procédé des Vampyrelles, à l'aide de tout petits pseudopodes. On dirait que les leucocytes subissent à la suite de l'injection intrapéritonéale une sorte d'excitation dans leur fonction phagocytaire.

La marche parallèle de la dissolution extracellulaire des hématies avec la phagolyse dans le péritoine, nous amène à conclure qu'une des substances nécessaires pour l'hémolyse, à savoir l'alexine de Bordet ou l'addiment d'Ehrlich, se trouve normalement dans le contenu des leucocytes, et ne passe dans les humeurs que lorsque ces cellules subissent une atteinte dans leur intégrité. Voilà pourquoi, malgré la présence dans le liquide de l'exsudat péritonéal de la « substance immunisante d'Ehrlich (Immunkorper) ou de la substance sensibilisatrice de Bordet », la dissolution extracellulaire des hématies peut être si facilement empêchée[1].

Comme déjà, lors d'une première injection de sang d'oie dans le tissu sous-cutané du cobaye, il se produit une dissolution humorale assez accentuée des hématies, on devrait supposer qu'il est impossible d'empêcher cette dissolution par un procédé quelconque chez des cobayes ayant reçu à plusieurs reprises du sang d'oie. Et cependant, cette suppression de la dissolution extracellulaire des globules rouges peut être facilement obtenue. Je dois rappeler au lecteur que nous avons été amené à admettre, dans le tissu sous-cutané de cobaye, une action dissolvante sur les hématies d'oie par le sérum de cet animal. En n'injectant

1. Je dois mentionner ici que les expériences, faites *in vitro* avec l'hémolyse du sang, saturé de CO^2, ont démontré que cet acide n'empêche nullement la dissolution des hématies.

sous la peau du cobaye que des globules rouges, débarrassés du sérum par la centrifugation et lavés avec de l'eau physiologique, on empêche sûrement la dissolution extracellulaire, et on obtient une phagocytose totale des hématies d'oie, ayant conservé leur hémoglobine. Dans cette phagocytose, on constate un rôle considérable des leucocytes polynucléaires, si nombreux dans l'exsudat sous-cutané. Il faut admettre que les injections préalables du sang d'oie ont progressivement habitué les polynucléaires de cobaye à saisir les hématies, ce qu'ils évitent de faire chez des animaux non préparés.

Les faits, réunis dans ce chapitre, servent donc pleinement à confirmer la théorie des deux substances, nécessaires pour l'hémolyse, et viennent à l'appui de la supposition que la « substance sensibilisatrice » est seule, à l'état normal, excrétée par les macrophages dans la période finale de la digestion intracellulaire des hématies d'oie. L'addiment reste beaucoup plus intimement lié au corps du leucocyte.

V

SÉRUM ANTILEUCOCYTAIRE

Dans les chapitres précédents, nous avons mis en lumière le rôle prépondérant que les macrophages jouent dans la résorption des cellules. Nous avons vu que ce sont surtout ces phagocytes mononucléaires qui s'emparent des éléments morphologiques, introduits dans l'organisme, et l'exemple des spermatozoïdes nous a prouvé que les macrophages sont bien capables de saisir même des cellules vivantes. Cet ensemble de faits indique le rôle considérable que les phagocytes mononucléaires doivent jouer dans l'atrophie cellulaire qui s'observe si souvent dans l'organisme.

On a établi depuis longtemps que dans des maladies atrophiques de beaucoup d'organes des plus importants pour la vie (centres nerveux, reins, foie), il se produit constamment, dans des foyers atteints, une accumulation des cellules mononucléaires qui se transforment en un tissu conjonctif, remplaçant ainsi les éléments plus nobles. Seulement on n'a jamais pu, d'une façon suffisante, déterminer la signification de ce processus.

D'après les données, réunies dans ce travail, on peut supposer que ces amas de mononucléaires représentent des phagocytes en train de dévorer divers autres éléments cellulaires, pour la plupart affaiblis par certaines causes morbides (en premier lieu à la suite d'intoxications). L'idée que ces cellules, avant de devenir la proie des macrophages, doivent mourir d'une cause quelconque, ne peut plus être défendue, en présence de faits constatés sur les spermatozoïdes et les hématies. D'un autre côté, il faut abandonner cette version courante que les phagocytes dévorent des organes et des tissus devenus « inutiles » pour l'organisme. Dans un autre travail[1] j'ai déjà objecté à cette interprétation purement téléologique le fait bien connu que beaucoup d'éléments réellement inutiles à l'organisme persistent néanmoins avec une ténacité remarquable (organes rudimentaires), tandis que d'autres cellules de la plus grande utilité, comme par exemple les cellules nobles dans des maladies atrophiques ou dans l'atrophie sénile, sont sans pitié dévorées par les macrophages. Il est infiniment plus probable que ces phagocytes ne se préoccupent nullement de l'utilité ou de l'inutilité pour l'organisme des cellules avec lesquelles ils se trouvent en rapport, mais qu'ils dévorent tout ce qui est à leur portée, c'est-à-dire tous les éléments incapables de se défendre contre leur voracité. On est donc amené à cette hypothèse que les cellules doivent produire des substances qui les défendent contre les macrophages, en provoquant chez eux une sensibilité négative. Et il est très facile de concevoir que des cellules des organes rudimentaires, ne jouant aucun rôle utile dans l'organisme, peuvent cependant se défendre par leurs produits, tandis que d'autres, indispensables pour le fonctionnement normal, peuvent, pour une raison quelconque, être dépourvues de leur substance protectrice.

Il est évident que dans les rapports quotidiens entre les diverses cellules d'un organisme, dans leur lutte intestine, les macrophages doivent occuper la première place. Comme on est en droit de prévoir que le temps n'est pas éloigné où l'art médical interviendra d'une façon active pour maintenir l'intégrité de l'organisme, dont l'harmonie se trouve rompue par la prépondérance de certains éléments cellulaires (macrophages dans les

1. *Delage*. Année biologique, 1899; sur l'atrophie sénile.

atrophies, divers autres éléments dans les maladies néoplasiques), je me suis mis à étudier l'effet que produit la résorption des macrophages. Dans ce but, j'injectai d'abord sous la peau de cobayes une émulsion de rates de rats, broyées avec de la solution physiologique de NaCl. 47 jours après une injection pareille, le sérum de sang de cobaye s'est montré agglutinant et dissolvant vis-à-vis des leucocytes, suspendus dans la lymphe abdominale de rats. Les mononucléaires sont atteints les premiers et transformés en vésicules transparentes avec le noyau rendu très visible; après vient le tour des polynucléaires qui subsistent les mêmes changements, et en dernier lieu ce sont les cellules d'Ehrlich (*Mastzellen*) qui sont atteintes. Le sérum de cobayes traités renferme donc une leucocidine très active, sous beaucoup de rapports analogue à celle qui est produite par certaines bactéries (staphylocoque, d'après la découverte de Van de Velde, bacille pyocyanique). Cette destruction de leucocytes se fait dans un espace de temps très court, et n'est nullement comparable à l'action, sur les mêmes éléments, du sérum de cobaye normal.

En injectant des ganglions lymphatiques du mésentère de lapins sous la peau de cobayes, j'ai obtenu un autre échantillon de sérum antileucocytaire. Mais, quoique ces ganglions ne renferment que des mononucléaires, l'action destructive du sérum des cobayes traités s'étend également aux leucocytes polynucléaires de lapins.

Les deux sérums antileucocytaires ont manifesté une spécificité tellement prononcée que le sérum, qui détruit rapidement les leucocytes des rats, s'est montré presque complètement inefficace contre les leucocytes des souris. Le sérum, préparé contre les leucocytes des lapins, n'a pas agi vis-à-vis de globules blancs de rats et inversement.

Je n'ai pas réussi à obtenir un sérum ne détruisant qu'une seule catégorie de leucocytes, ce qui serait nécessaire pour empêcher l'action des macrophages dans les processus atrophiques. Malgré cet échec, nous pensons qu'il est néanmoins possible d'intervenir dans la lutte intrinsèque entre les cellules. En tenant compte de cette loi générale, d'après laquelle les faibles doses des poisons et des antiseptiques exercent une action stimulante, il y a lieu de rechercher (comme cela se poursuit dans

notre laboratoire), si les sérums spécifiques, agissant contre les cellules en fortes doses, n'exciteraient pas les mêmes éléments, après application de doses très faibles.

D'un autre côté, ces sérums anticellulaires peuvent être employés comme moyen d'étude physiologique sur le fonctionnement de certains organes, difficiles ou impossibles à éliminer de l'organisme par voie chirurgicale. Quelques-uns d'entre ces sérums peuvent recevoir encore d'autres applications. Ainsi, le sérum antiphagocytaire pourrait être employé dans le but d'affaiblir la réaction de l'organisme, et, par conséquent, pour augmenter la virulence de certains microbes.

VI

RÉSUMÉ

1. La résorption des cellules est principalement l'œuvre des macrophages.

2. Les macrophages peuvent saisir non seulement des cellules, préalablement tuées par une cause quelconque, mais aussi des cellules sûrement vivantes.

3. Dans cette phagocytose mononucléaire, il faut citer comme remarquable la saisie des cellules par de tout petits pseudopodes qui s'accolent à elles, d'une façon semblable au procédé par lequel les Vampyrelles s'emparent du contenu des algues.

4. Les hématies d'oie, injectées dans le péritoine de cobayes, sont dévorées presque exclusivement par des macrophages qui, au bout de quelque temps, abandonnent la cavité péritonéale, passent dans l'épiploon, les ganglions lymphatiques, la rate et le foie, et se dirigent vers le sang.

5. Les substances agglutinantes et hémolytiques se retrouvent principalement dans le sang.

6. La substance sensibilisatrice (ou Immunkörper) est très probablement une excrétion de macrophages arrivés à la fin de la digestion intracellulaire.

7. La dissolution extracellulaire des hématies d'oie peut être empêchée chez des cobayes, dont les humeurs sont hémolytiques. Ce fait indique que la substance sensibilisatrice excrétée,

et circulant dans le sang, nécessite l'intervention d'une autre substance plus intimement liée aux phagocytes.

8. La résorption des macrophages provoque la formation de sérum qui détruit aussi les leucocytes polynucléaires et les cellules d'Ehrlich.

EXPLICATION DES FIGURES

DES PLANCHES VII ET VIII

Fig. 1-4. Englobement des spermatozoïdes humains par les macrophages de cobaye, 4 heures après l'injection du sperme dans le péritoine. Grossissement : Oc. 4 + 1/12 Zeiss.

Fig. 5 a, b, c. — Trois stades de mouvement de la queue d'un spermatozoïdes dont la tête est déjà englobée par un macrophage de cobaye. L'exsudat a été retiré 4 heures après la première injection d'un c. c. de sperme dans le péritoine de cobaye. Grossiss. Oc. 3 + 1/12 Zeiss.

Fig. 6 et 7. Changements des zoospermes humains dans les macrophages de cobaye.

Fig. 8 et 9. Digestion des zoospermes dans l'intérieur des macrophages. L'exsudat péritonéal de cobaye a été retiré 25 heures après la seconde injection de 0,5 c. c. de sperme. Oc. 4 + 1/12 Z.

Fig. 10. Un macrophage de la cavité péritonéale de cobaye, accolé à plusieurs hématies d'oie. Deux hématies libres. L'exsudat a été pris 3 jours après une injection de 5 c. c. de sang défibriné d'oie. Oc. 3 + 1/12.

Fig. 11. Quatre macrophages, ayant fixé par leurs pseudopodes des hématies d'oie. Exsudat péritonéal de cobaye, retiré une heure après une injection de 0,5 c. c. de sang d'oie. Oc. 3 + 1/12.

Fig. 12. Un macrophage de cobaye, ayant englobé une hématie d'oie et fixé sur sept autres hématies. L'exsudat a été pris une demi-heure après une troisième injection intrapéritonéale de 0,5 c. c. de sang d'oie. La goutte suspendue de l'exsudat a été traitée par une solution aqueuse de bleu de méthylène. 3 + 1/12.

Fig. 13. Un macrophage de la cavité péritonéale de cobaye, 22 heures après une injection de 3 c. c. de sang d'oie. On voit deux modes de digestion intracellulaire des hématies.— *a*, globules rouges avec le noyau incolore et le contenu fortement coloré par l'hémoglobine. Oc. 3 + 1/12.

Fig. 14. Deux macrophages de cobaye avec des hématies, présentant le noyau incolore et le contenu coloré. Oc. 4 + 1/12. L'exsudat péritonéal a été retiré 72 heures après une injection de 7 c. c. de sang d'oie.

Fig. 15. *a*. Un macrophage du péritoine de cobaye dans une goutte sus-

pendue d'exsudat, retiré 24 heures après l'injection d'un c. c. de sang d'oie. — *b*, le même macrophage, 15 minutes après le stade *a*. Les masses des hématies réunies ont cédé une partie de leur hémoglobine au protoplasma du macrophage. — *c*. une partie du même macrophage, un quart d'heure après le stade *b*. Oc. 4 + 1/12.

Fig. 16. Fragment d'une coupe de l'épiploon de cobaye, sacrifié six jours après une injection intrapéritonéale de 7 c. c. de sang d'oie. — *a*, hématies d'oie avec noyau incolore et le contenu coloré par l'hémoglobine. Sc. 3 + 1/18.

Fig. 17. Fragment d'une coupe du foie[1] du même cobaye. Entre les cellules hépatiques se trouve un macrophage allongé et renfermant des hématies d'oie et leurs débris. — *a* hématie avec noyau incolore. Oc. 3 + 1/18.

Fig. 18. Un autre fragment de la même coupe. Un macrophage, renfermant deux hématies d'oie (a) avec noyau incolore, est logé dans une grosse veine. Oc. 3 + 1/18.

Fig. 19. Un macrophage de cobaye, retiré de la veine cave inférieure d'un cobaye, ayant reçu, 4 jours auparavant, 7 c. c. de sang d'oie dans le péritoine. — *a*, hématie en forme de tonneau Oc. 3 + 1/12.

Fig. 20. Macrophages de cobaye et hématies d'oie, retirés trois minutes après une injection péritonéale d'1 c. c. de sang d'oie, saturé de CO^2. Le cobaye avait préalablement reçu 4 injections du sang d'oie.— *a*, hématies d'oie, dont le contenu a été dissous dans le liquide de l'exsudat ; — *b*, macrophages, saisissant des hématies d'après le procédé des amibes. — *c*, un macrophage qui se fixe sur les hématies, d'après le procédé des Vampyrelles. Oc. 3 + 1/12.

Fig. 21. Un macrophage de cobaye, rempli d'hématies d'oie et fixant sur sa surface six autres hématies. Autour du macrophage se trouvent 5 globules rouges d'oie, dont le contenu a été dissous dans le liquide (a) et deux lymphocytes de cobaye(b). Au dehors du macrophage, on voit deux amas d'hématies agglutinées. L'exsudat péritonéal a été retiré deux heures après une (troisième) injection de sang d'oie. Oc. 3 + 1/12.

Fig. 22. Un macrophage de cobaye, dans une goutte suspendue d'exsudat péritonéal, retiré le quatrième jour après une injection de sang d'oie. Dans le contenu du mononucléaire, on voit des débris de noyaux des hématies, colorés par l'hémoglobine. 3 + 1/12.

Fig. 23. Un leucocyte polynucléaire de cobaye, dans l'exsudat péritonéal, retiré 24 heures après une troisième injection de sang d'oie. — *a*, hématie englobée. Oc. 4 + 1/12.

1. Les coupes des organes ont été obligeamment préparées par M. *Matchinsky*.

APPENDICES

I

PROPRIÉTÉS AGGLUTINATIVE ET HÉMOLYTIQUE DES HUMEURS ET DES ORGANES DE COBAYES NORMAUX VIS-A-VIS DES HÉMATIES D'OIE.

COBAYES	SÉRUM DU SANG		SÉRUM DE LA lymphe péritonéale.		ÉPIPLOON		GANGLIONS MÉSENTÉRIQUES.		RATE	
	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.
Nos 1.	5 : 1	—	5 : 1	—			—	—		10 : 1
2.	20 : 1	—				10 : 1				10 : 1
3.	—	—				1 : 1		3 : 1		—
4.	—	—				1 : 1		10 : 1		1 : 1
5.	—	—				1 : 1		3 : 1		3 : 1
6.	10 : 1	—				1 : 1		5 : 1		—

III

PROPRIÉTÉS AGGLUTINATIVE ET HÉMOLYTIQUE DE COBAYES, AYANT REÇU 7 C. C. DE SANG D'OIE SOUS LA PEAU.

COBAYES	SÉRUM SANGUIN		ÉPIPLOON		GANGLIONS MÉSENTÉRIQUES		GANGLIONS DE L'AINE		RATE		FOIE	
	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.
Nos 1. 4 jours ap. l'inj.	—	—		3 : 1	—	—			—	—	—	—
2. 4 jours.	—	—		3 : 1		10 : 1	—	—	—	—		
3. 8 jours	1 : 1	—										
4. 9 jours	3 : 1	10 : 1		1 : 1		10 : 1			3 : 1	—	1 : 1	—
5. 13 jours	1 : 1	10 : 1		1 : 1		1 : 1	1 : 1	—	1 : 1	—		
6. 14 jours	3 : 1	10 : 1	3 : 1	—		1 : 1	10 : 1	[illegible]	[illegible]		1 : 1	—
7. 20 jours	1 : 1	3 : 1 (1 heure.)	1 : 1	—		1 : 1	1 : 1	—	3 : 1	—		
8. 30 jours	1 : 1	3 : 1 [illegible]		1 : 1		10 : 1				[illegible]		
9. 106 jours		3 : 1										

II. — PROPRIÉTÉS AGGLUTINATIVE ET HÉMOLYTIQUE DES HUMEURS ET DES ORGANES DES COBAYES, AYANT REÇU 7 C. C. DE SANG D'OIE DANS LE PÉRITOINE.

COBAYES	SÉRUM SANGUIN		SÉRUM DU LIQUIDE PÉRITONÉAL		LIQUIDE DU PÉRICARDE		EPIPLOON		GANGLIONS DU MÉSENTÈRE		RATE		FOIE		MOELLE DES OS	
	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.	Agglut.	Hémol.
Nos 1. 12 heures apr. l'inject.	10 : 1	—						20 : 1		20 : 1	—	—	—	—		
2. 3 jours apr. l'inject.	1 : 1	—						10 : 1		10 : 1	—	—	10 : 1			—
3. 4 jours.	5 : 1	—			10 : 1	—				5 : 1	20 : 1	—	5 : 1	—		
4. 4 jours.	10 : 1	—					10 : 1	—	—	—	10 : 1	—				
5[1]. 5 jours.	1 : 10	—							5 : 1	5 : 1	+	—	+	—		
6. 6 jours.	10 : 1	—								3 : 1	10 : 1	10 : 1	10 : 1	—	10 : 1	—
7. 6 jours.	1 : 1	—						1 : 1		1 : 1	3 : 1	—	3 : 1	—		
8[2]. 6 jours.	1 : 10	10 : 1	10 : 1	—						10 : 1		5 : 1	10 : 1	—		
9. 7 jours.	1 : 1	10 : 1	1 : 1							5 : 1	5 : 1	5 : 1	5 : 1	—		

10[3]. 7 jours.	1 : 1	—							10 : 1	—	5 : 1	—	5 : 1	—		
11. 13 jours.	1 : 1	3 : 1						1 : 1		3 : 1		10 : 1				
12. 14 jours.	1 : 1	3 : 1						1 : 1	3 : 1		1 : 1	—	1 : 1	—		
13. 15 jours.	1 : 1	3 : 1					1 : 1	10 : 1		10 : 1	1 : 1	—	10 : 1	—		
14. 17 jours.	1 : 1	1 : 1						3 : 1		3 : 1		1 : 1				
15. 21 jours.	1 : 1	3 : 1														
15. 30 jours.	1 : 1	3 : 1						1 : 1		1 : 1	3 : 1	—				
16. 105 jours.		1 : 1														
17. 106 jours.		1 : 1														

1. Pour le cobaye 5, les pouvoirs agglutinatif et hémolytique ont été nuls dans les capsules surrénales.
2. Pour le cobaye 8, le pouvoir agglutinatif du poumon était 5 : 1, celui des reins 10 : 1. Le pouvoir hémolytique était nul dans les 2 organes.
3. Pour le cobaye 10, les 2 pouvoirs ont été nuls dans la moelle et le cerveau.

Contribution à l'étude du sort des levures dans l'organisme.

PAR LE Dr SKCHIWAN, D'ODESSA.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Cette question a été depuis longtemps l'objet de nombreuses recherches [1] : la découverte des levures pathogènes pour l'homme et les animaux la remet de nouveau à l'ordre du jour.

Au cours de mes études sur les levures pathogènes, j'ai eu l'occasion d'observer certains faits qui permettent de donner une interprétation différente de celle qui a été proposée jusqu'ici par Gilkinet [2] et Iona [3].

Bien que mes recherches ne soient pas encore terminées, je crois utile d'exposer dès maintenant quelques faits qui présentent un intérêt général.

Déjà, dans le travail de Schattenfroh [4], on trouve des indications sur le rôle exclusif de la phagocytose dans la destruction des levures dans l'organisme. Je ne peux que confirmer ses résultats, tout en faisant remarquer que la phagocytose des levures, surtout des levures pathogènes, présente certaines particularités qui méritent d'être étudiées de plus près.

I

INJECTION DES LEVURES DANS LA CAVITÉ PÉRITONÉALE

Saccharomyces subcutaneus tumefaciens. Cette espèce, isolée par M. Curtis [5], m'a été donnée par M. le professeur Metchnikoff. Je me servais des cultures de 2-3 jours sur gélose légèrement acide, et additionnée de sucre à 1 1/2 0/0. Il se forme au bout de ce temps

1. JOHANNEZ RAUM, Zur Morphologie und Biologie der Sprosspilze, *Zeitschrift für Hygiene und Infections Krankheiten*. B. X, 1891, p. 35-50.

2. G. GILKINET, Recherches sur le sort des levures dans l'organisme, *Archives de Méd. expér.* 1897, p. 881-901.

3. IONA, Die Schutzmittel des Organismes gegen die Blastomyceten, *Centr. für Bacter.*, 1897, B. XXI, p. 147-150.

4. SCHATTENFROH, Ueber die Beziehungen der Phagocytose zur Alexinwirkungen bei Sprosspilzen und Bacterien, *Archiv. für Hygiène*, B. XXVII, p. 234-236.

5. Avant de commencer les expériences, nous avons fait deux passages de la vieille culture au moyen des sacs en collodion placés pour 3-4 jours dans le péritoine des lapins.

un voile épais, facile à enlever et transformer en une émulsion homogène dans une solution physiologique.

A l'aide d'un tube effilé, nous prélevons un peu de liquide péritonéal après différents intervalles, au bout de 5, 10, 30, 40, 60 minutes, 2, 3, 6, 12, 29, 36 heures après l'injection. Le liquide louche que l'on obtient de cette façon en assez grande quantité servait pour les ensemencements (sur le même milieu que plus haut) et pour l'examen microscopique en goutte pendante et sur des préparations colorées (bleu de méthylène, thionine, eosine-bleu de méthylène), après fixation préalable dans l'alcool-éther.

Pour ne pas entrer dans les détails des expériences, nous rapporterons seulement les conclusions générales auxquelles elles donnent lieu.

En injectant des petites doses à des cobayes (1/10-1/5-1/3 de culture sur gélose), nous avons observé ceci :

Immédiatement après l'injection, les leucocytes très abondants dans le liquide péritonéal, disparaissent, et on ne constate dans l'exsudat, retiré après 5, 10, 20, 30, que de rares lymphocytes.

Après cette période de phagolyse, les leucocytes commencent à affluer dans la cavité péritonéale ; seulement, encore pendant un certain temps, 10 à 30 minutes, on ne voit pas de phagocytose : il se passe une *stase* leucocytaire, pour ainsi dire.

Puis, la phagocytose apparaît avec les caractères qui ont été si souvent décrits : remarquons seulement que les pseudo-éosinophiles polynucléaires y prennent une part active (fig. 1).

En examinant l'exsudat en goutte pendante, ainsi que sur des préparations colorées, il est souvent facile de constater une *collaboration* des leucocytes. Quand il s'agit d'envelopper et d'englober une cellule de levure, plusieurs leucocytes, 2 à 8, venant de différents côtés, se mettent ensemble pour entourer un globule avec leurs pseudopodes ; puis les leucocytes se fusionnent entre eux, en formant une sorte de couronne ou de rosace, dont le centre est occupé par la levure (fig. 2, 3, 4, 5, 6). A côté de ceci on voit également une phagocytose polynucléaire, telle qu'elle se présente en général. Les levures englobées par les polynucléaires changent au point de vue de leur colorabilité ; ainsi la levure devient de moins en moins apte à se colorer par le bleu ; elle

prend une couleur violette, puis rose ; ses dimensions diminuent, et finalement elle se transforme en une masse irrégulière que l'on ne pourrait reconnaître qu'en suivant sa destruction progressive.

Cette transformation, assez rapide dans les polynucléaires, s'effectue beaucoup plus lentement dans les gros mononucléaires, dont le rôle, très effacé au début, devient tout à fait prépondérant après 25 heures.

Conformément aux indications de Busse [1], il se forme, après 24 heures, une capsule autour des levures pathogènes injectées. Sur des préparations non colorées, cette capsule se présente sous forme d'un cercle clair : sur des préparations colorées, elle donne lieu à une métachromatie accentuée (fig. 6, 8).

L'apparition de la métachromatie rend plus compliquée la digestion des levures qui se faisait auparavant par les polynucléaires (dans les 24 heures). La phagocytose se fait maintenant aux dépens des mononucléaires; de même les rosaces, composées primitivement des polynucléaires, sont maintenant constituées par des mononucléaires.

L'englobement des levures par les leucocytes dure 2-3 jours environ; au bout de ce temps il n'est plus possible de constater dans l'exsudat des levures libres ; cependant, en ensemençant l'exsudat même au bout de 3-5 jours, on obtient de riches cultures de levures: les jours suivants, les cultures deviennent de moins en moins abondantes et plus lentes à se faire; seulement même au 9-11e jour, quand on a beaucoup de peine à trouver dans l'exsudat des leucocytes contenant des débris de levures, les ensemencements donnent encore lieu à des colonies isolées apparaissant au bout de 4 à 6 jours.

Il en résulte donc que les leucocytes englobent les levures à *l'état vivant:* on peut s'en assurer encore plus facilement en additionnant un peu de moût de bière à l'exsudat retiré après 3 ou 4 jours. Lorsqu'on examine cet exsudat en goutte pendante, et que l'on surveille attentivement un point déterminé, on peut voir comment une levure englobée se met à pousser, germe, finit par sortir du leucocyte, et donne naissance à des nouvelles colonies.

1. O. Busse, *Die Hefen, als Krankheitserreger,* Berlin, 1897.

Examinons maintenant le sort des « rosaces » leucocytaires dont il a été question plus haut.

Au début de leur formation on voit nettement qu'elles sont composées de leucocytes isolés; plus tard les limites entre les cellules cessent d'être visibles : on se trouve en présence d'une sorte de *cellule géante* présentant au centre la levure dégénérée et à la périphérie les noyaux des leucocytes (fig. 8, 9, 10).

La digestion des levures dans cette cellule complexe s'effectue très probablement aussi lentement que dans les mononucléaires.

Quand on injecte à un cobaye une dose considérable de levure (1-2 cultures sur gélose), la mort survient au bout de 3-7 jours. L'exsudat péritonéal présente alors un aspect tout différent de celui qui a été décrit plus haut; la phagocytose apparaît plus tard, est moins accentuée : quant aux levures libres, leur nombre augmente de plus en plus.

Les levures acquièrent des dimensions inusitées, et la capsule devient quelquefois plus épaisse que le corps même de la levure. L'exsudat est hémorragique.

Les levures passent de la cavité péritonéale dans les organes et dans le sang, et la mort survient avec des phénomènes septicémiques.

A l'examen microscopique de l'exsudat après la mort, on voit, à côté des levures libres en grande quantité, entourées de grosses capsules, des phénomènes phagocytaires : les macrophages sont bourrés de levures, et par leur destruction donnent lieu à une vacuolisation très prononcée (fig. 11, 12).

A l'autopsie, les organes sont hyperémiés, œdématiés : à l'examen microscopique on constate des levures libres, mais aussi des levures englobées, subissant une dégénérescence à l'intérieur des macrophages.

L'ensemencement du sang du cœur et des organes donne des cultures abondantes de levure.

Lorsqu'on injecte dans la cavité péritonéale une émulsion des levures de Curtis, tuées par l'ébullition, la phagocytose se fait beaucoup plus rapidement : déjà six heures après l'injection, on ne constate plus de levures libres dans l'exsudat, elles sont toutes englobées par les leucocytes; ici aussi a lieu la formation des « rosaces ». La destruction des levures dans

les leucocytes et dans les « rosaces » peut être constatée dans l'exsudat encore après 2-4 jours.

Levure rose.— L'injection des cultures vivantes de cette levure (ces expériences ont été identiques à celles exécutées avec le *Saccharom. tumefaciens*) ne s'accompagne pas de formation des « rosaces ».

La réaction de l'organisme rappelle en général celle provoquée par les levures de Curtis. La période qui est consécutive à la phagolyse, et que nous avons désignée sous le nom de stase leucocytaire (parce que les leucocytes, tout en étant en grand nombre, ne phagocytent encore pas) est un peu plus longue. Ce n'est qu'au bout de 10-16 heures après l'injection que les phénomènes leucocytaires commencent à être fréquents. L'exsudat est alors composé exclusivement de polynucléaires, et principalement des pseudo-éosinophiles. Les levures qui y sont renfermées donnent rarement lieu à la métachromatie. On voit souvent des levures entourées de tous côtés par des noyaux multilobés d'un polynucléaire.

Plus tard, à un stade avancé de la digestion, le polynucléaire revêt la forme d'une bague : la levure est située à sa portion fine et est entourée d'une sorte de capsule ; tout le long de la périphérie sont disposées les granulations pseudo-éosinophiles ; la portion épaisse est occupée par le noyau, la partie centrale de la cellule présente une énorme vacuole.

Ici aussi, comme nous l'avons vu pour le *Saccharom. tumefaciens*, la phagocytose polynucléaire cède la place après 24 heures à celle faite aux dépens des mononucléaires. En examinant l'exsudat de jour en jour, on peut voir après 2-3-7 jours une quantité de mononucléaires bourrés de levures. Plus tard, le nombre des cellules en état de phagocytose diminue jusqu'au 10-12e jour, quand il devient déjà difficile de trouver, dans les cellules, des levures en état de décomposition.

L'exsudat, ensemencé après 1-5 jours, fournit une abondante culture : puis on n'obtient que des colonies isolées ; au bout de 8-10 jours il n'y a plus de cultures. Telle est la marche de la phagocytose pour ces deux espèces de levures sauvages. Les choses se passent autrement avec des levures ordinaires.

Pour étudier ces dernières, je me suis servi d'une culture de *Saccharomyces Pastorianus*, isolée par le procédé général des

levures pressées : cette levure m'a été gracieusement offerte par M. Fernbach.

Ici la phagocytose apparaît et marche plus rapidement qu'avec les levures sauvages. Aussitôt après la phagolyse s'établit une phagocytose très prononcée, de sorte que déjà après deux heures toutes les levures se trouvent englobées ; après 3-4 heures les ensemencements restent stériles.

La phagocytose se fait presque exclusivement aux dépens des polynucléaires. On peut constater la présence des levures et leur destruction encore pendant 24 à 48 heures. Il ne nous fut pas possible de constater le phénomène de métachromatie, ni la formation de la capsule.

II

INJECTION DANS LE SYSTÈME SANGUIN

En injectant des cultures de *Saccharomyces tumef.* dans la veine marginale de l'oreille des lapins, nous n'avons pu constater la destruction rapide des levures. L'examen microscopique du sang, au stade d'hypoleucocytose qui suit immédiatement l'injection, permet de constater des levures englobées par des leucocytes, ainsi que des petites rosaces de 2-3 leucocytes entourant une levure (fig. 15, 16).

A l'examen des organes des animaux sacrifiés au bout de 10, 20, 40 heures après l'injection, on trouve toutes les levures déjà englobées par les macrophages, et en grande partie à l'état vivant, puisque les organes ensemencés fournissent une abondante culture.

On obtient des cultures même au bout de 5-6 jours, mais elles sont alors beaucoup moins riches.

La destruction des *Saccharomyces Pastorianus* injectés dans le sang de lapin a lieu en un temps plus court que pour le *Saccharom. tumef.* On peut au début constater leur présence dans le sang et par l'examen microscopique et par des cultures ; après 1-2 heures, elles disparaissent du sang, mais les organes ensemencés donnent encore des cultures. Celles-ci

manquent déjà après 3-4 heures. A l'examen des organes, on peut voir les levures à l'intérieur des macrophages.

Nous pouvons donc conclure que la destruction des levures pathogènes, aussi bien que non pathogènes, relève en grande partie de la propriété digestive des leucocytes : les leucocytes englobent les levures à l'état vivant, et c'est là que celles-ci subissent la destruction définitive.

Ces expériences n'excluent cependant pas l'action bactéricide des humeurs de l'organisme sur les levures. Il faudrait également tenir compte de l'action nocive possible, due d'un côté à la température du corps des animaux d'expérience, et de l'autre côté au mauvais milieu que forment les liquides de l'organisme.

Afin de me rendre compte de l'importance de ces deux causes qui viennent d'être indiquées, j'ai fait quelques expériences avec des levures non pathogènes, le phénomène devant se présenter plus nettement avec elles.

Nous avons ensemencé une anse de *Saccharom. Pastorianus* dans deux tubes à essai contenant du liquide d'ascite non stérilisé; un de ces tubes a été mis à l'étuve, l'autre gardé à la température de la chambre; 48 heures après, le contenu des deux tubes a donné des cultures abondantes sur gélose. Même après dix jours, le contenu des tubes mis en présence de moût de bière a donné lieu à une fermentation.

Pour se mettre autant que possible dans les conditions naturelles, nous avons placé les *Saccharom. Pastorianus* dans des tubes capillaires scellés d'un côté, et le tout a été introduit sous la peau des cobayes et des lapins. En raison de la chimiotaxie très faible que provoquent les levures, la plupart des tubes restaient libres de leucocytes, au moins pendant les premiers jours (1-3) pendant lesquels on faisait l'observation. Les levures renfermées dans les tubes capillaires, ensemencées sur gélose, ont donné des cultures d'abord abondantes et en peu de temps; le troisième jour elles ont donné des cultures tardives (après 4-6 jours).

Il résulte de ces expériences que l'on ne peut guère invoquer les deux causes signalées plus haut pour faire comprendre la destruction rapide des levures dans l'organisme.

Il nous reste encore une hypothèse d'après laquelle le sérum

ou le sang des animaux posséderait des propriétés bactéricides vis-à-vis des levures.

Déjà l'expérience avec les tubes capillaires est suffisamment explicite à cet égard et plaide contre cette hypothèse ; mais les expériences avec les sacs en collodion sont encore plus démonstratives ; nous mettons des cultures de *Sachar. Pastorianus*, renfermées dans ces sacs, dans la cavité péritonéale de lapins ; au bout de 1-2-3 jours on retire le sac, et son contenu donne toujours une abondante culture.

La destruction des levures pathogènes et non pathogènes rentre donc dans les lois générales de la phagocytose.

En présence des levures pathogènes qui survivent et se multiplient au sein de l'organisme, il faut donc admettre qu'il s'agit là, d'un côté, d'une accoutumance de cette espèce aux conditions de température et du milieu ; d'un autre côté d'une sécrétion de substances paralysant l'activité leucocytaire.

A cela il faut ajouter enfin l'apparition chez les levures d'un moyen de défense, sous forme de capsule, qui rend impuissant même tout un ensemble de leucocytes « en coopération », comme nous l'avons déjà vu se faire au début de notre travail.

Il n'est pas inutile d'ajouter que le phénomène de « rosace » a lieu également dans l'exsudat pleural des cobayes à la suite de septicémie des levures (fig. 17). Nous l'avons vue aussi se former dans un abcès sous-cutané d'un chien auquel on a injecté des levures de Curtis. Dans ce dernier cas, les levures avec leurs capsules, ainsi que les « rosaces » ont acquis des dimensions très considérables.

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE IX

1. Exsudat de cobaye après 16 heures, éosine, bleu de méthylène. Zeiss. Ocul, 8, obj. 2. Un leucocyte pseudo-éosinophile.
2. Exsudat à la suite de culture tuée après 6 heures. Bleu de méthylène. Zeiss 6-2.
3. Exsudat de cobaye après 3 jours. Bleu de méthylène. 4-2.
4. Exsudat de lapin après 2 jours. Bleu de méthylène. 6-2.
5. Exsudat de cobaye après 3 jours. Bleu. 4-2.
6. Exsudat de lapin après 16 heures. Bleu-éosine. 6-2.
7. Exsudat de cobaye après 2 jours. 6-2.
8. Exsudat de cobaye après 6 heures. Bleu-éosine. 8-2.
9. Exsudat de cobaye après 6 heures. Bleu-éosine. 8-2.
10. Exsudat de cobaye après 4 jours. Bleu-éosine. 4-2.
11. Exsudat de souris après 48 heures. Bleu-éosine. 8-2.
12. *Idem.*
13. Exsudat de cobaye après la mort. Bleu. 8-2.
14. Sang de lapin après 10 minutes. Bleu-éosine. 6-2.
15. *Idem.*
16. Exsudat pleural de cobaye. Bleu. 4-2.
17. Une cellule de levure, entourée par une rangée de mononucléaires.

Nouvelles recherches sur l'immunité contre le sérum d'anguille.

Contribution à l'étude de l'immunité naturelle.

PAR L. CAMUS ET E. GLEY

Dans plusieurs notes et dans un mémoire antérieurement publiés [1], nous avons montré que le sérum d'anguille, qui dissout très facilement les globules rouges du lapin, perd cette propriété si on y ajoute du sérum sanguin d'un lapin préalablement immunisé contre ce sérum d'anguille [2]; que cette action du sérum d'animal immunisé se ramène à un phénomène chimique (action directe de l'antitoxine sur la toxine); qu'il existe des animaux, comme le hérisson, pourvus d'une résistance plus ou moins marquée à la toxine dont il s'agit, et que, chez ces animaux, les globules rouges ne sont pas détruits par cette substance. Ces faits et d'autres encore que l'on trouve dans les travaux indiqués ci-dessus nous ont permis de dire que nous avions établi sur des preuves très simples, reposant en grande partie sur des expériences *in vitro*, les données suivantes : « la réaction directe d'une antitoxine sur une toxine ; l'atténuation

1. L. Camus et E. Gley : De la toxicité du sérum d'anguille pour des animaux d'espèce différente (Lapin, Cobaye, Hérisson) (*Comptes rendus Soc. de Biol.*, 29 janvier 1898, p. 129); — De l'action destructive d'un sérum sanguin sur les globules rouges d'une autre espèce animale. Immunisation contre cette action (*Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, CXXVI, p. 428, 31 janvier 1898); — Sur le mécanisme de l'immunisation contre l'action globulicide du sérum d'anguille (*Ibid.*, CXXVII, p. 330, 8 août 1898); — Recherches sur l'action physiologique du sérum d'anguille. Contribution à l'étude de l'immunité naturelle et acquise. (*Arch. intern. de pharmacodynamie*, V, p. 247-305, 1898).

2. Dans un travail publié dans ces *Annales* (XIII, p. 406, 25 mai 1899), Tchistovitch attribue cette découverte à H. Kossel. « Cette découverte de Kossel, écrit-il, a été confirmée dans ces derniers temps par MM. Camus et Gley » (*loc. cit.*, p. 406); et, plus loin, il dit encore : « Ce fait (il s'agit de la résistance des hématies des lapins immunisés à l'action dissolvante du sérum d'anguille) a été confirmé par Camus et Gley sans réserve » (p. 409). Tchistovitch n'a évidemment pas consulté les textes originaux, puisque les notes dans lesquelles nous avons démontré cette « découverte » sont du 29 et du 31 janvier 1898, et que celle de Kossel est du 14 février 1898 (Zur Kenntniss der Antitoxinwirkung : *Berliner klin. Wochens.*, 14 février 1898). On peut voir d'ailleurs dans la note de Kossel une brève mention de nos expériences. Abstraction faite, comme il convient, de toute question spécieuse de priorité, le vrai est, ainsi que nous l'avons écrit déjà (*Arch. de pharmacody.*, p. 290), que Kossel « avait de son côté conçu et réalisé d'une manière indépendante la même expérience » que nous.

d'une toxine par le chauffage et la non-atténuation de l'antitoxine; la formation d'une antitoxine par une réaction de l'organisme produite sans intervention de la toxine correspondante; le moyen, par l'étude d'une réaction cellulaire simple, de constater l'apparition de l'antitoxine et de suivre les variations de l'activité de cette substance; la détermination de la nature des deux sortes d'immunité, la naturelle, qui tient à une propriété de cellule, et l'acquise, qui dépend des propriétés d'une antitoxine et de la neutralisation chimique de la toxine par cette antitoxine; la détermination, dans l'immunité acquise elle-même, à côté de ce mécanisme chimique, d'un mécanisme perfectionné, qui n'est autre chose qu'une immunisation d'ordre cytologique, comme est l'immunité naturelle » (L. Camus et E. Gley, *Arch. intern. de pharmacodynamie*, V, p. 304, 1898).

Depuis lors, continuant ces recherches, nous nous sommes attachés d'abord à l'étude de la distinction entre les deux sortes d'immunité, cytologique et humorale.

I. En premier lieu, nous avons cherché s'il ne serait pas possible d'obtenir à coup sûr des animaux chez lesquels l'immunité, due à la production d'une antitoxine et à la présence dans le sang de cette antitoxine, ferait place à l'immunité tenant à une résistance non plus naturelle, mais acquise des hématies dans le cas particulier. Rappelons que dans toutes nos expériences il s'agit d'apprécier la résistance des globules rouges à l'action du sérum d'anguille.

Pour voir si l'immunité cytologique ne se substituerait pas à l'immunité humorale, il était assez rationnel se prolonger l'immunisation des animaux en expérience[1]. On pouvait en

1. Dans ces recherches nous avons immunisé les animaux au moyen du sérum normal d'anguille. Dans nos recherches antérieures, nous avions également employé dans ce but le sérum chauffé à 58° pendant un quart d'heure (voy. notre mémoire des *Arch. intern. de pharmacodynamie*, p. 279-281 et 296-299); et nous avions constaté que l'antitoxine obtenue de cette façon se comporte comme celle qui se forme dans l'immunisation par le sérum normal, et essayé de tirer les conséquences de ce fait. Tchistovitch (voy. p. 411 de son mémoire) ne semble pas avoir eu connaissance de nos expériences sur ce point.

Par contre, et contrairement à ce que nous avions montré (p. 257 et suiv. de notre mémoire), il soutient que le chauffage du sérum d'anguille à 55° pendant une demi-heure laisse intacte la toxicité de ce liquide pour les lapins. Voici quelques expériences qui sont tout à fait opposées à cette opinion : 1° Cobaye ♂ de 670 gr., qui reçoit dans la veine jugulaire droite 0 c. c. 1 de sérum dilué dans 1 c. c. d'eau salée, et chauffé à 55° pendant une demi-heure; observé pendant

effet se demander si les globules des animaux soumis pendant longtemps à l'action de doses, d'abord faibles, puis progressivement plus fortes, de sérum d'anguille, n'acquerraient pas peu à peu une résistance plus ou moins comparable à celle des animaux pourvus de l'immunité naturelle.

Jusqu'ici nos expériences n'ont pas été favorables à cette supposition. Voici, par exemple, un lapin qui, du 8 novembre 1898 au 4 mars 1899, reçoit dans les veines, par doses de 0 c. c. 01, puis de 0 c. c. 02, 0,03, 0,04, 0,05, enfin de 0,1, 0,2, 0,3 et 0,4, en tout 3 c. c. 05 de sérum d'anguille. Le 10 mars, on lui fait par l'artère fémorale une saignée de 20 c. c.; le sang est reçu dans une solution d'oxalate neutre de potasse, pour empêcher la coagulation; puis on le soumet à l'action de la force centrifuge pendant plusieurs heures; on décante le plasma, on lave trois fois de suite la bouillie globulaire avec une solution de chlorure de sodium à 10 0/00; on enlève ensuite la couche supérieure. On éprouve alors la résistance des globules ainsi lavés, débarrassés par conséquent de toute trace de plasma pouvant contenir de l'antitoxine; et ces globules n'ont pas montré une grande résistance au sérum d'anguille; du moins ils se dissolvaient encore en partie sous l'influence de 1/2000 de ce sérum [1].

plus d'une heure, il ne présente aucun trouble; le lendemain il est très bien portant. — 2° Cobaye ♀ de 230 gr.; injection dans la veine jugulaire droite de 0 c. c. 1 de sérum dilué dans 1 c. c. d'eau salée, et chauffé à 55° pendant une demi-heure. Rien à noter. — 3° Expérience témoin: Cobaye ♂ de 640 gr.; injection dans la veine jugulaire de 0 c. c. 05 du même sérum non chauffé, dilué dans 0 c. c. 5 d'eau salée; mort en une minute. — 4° Lapin ♀, pesant 1820 gr.; injection intra-veineuse de 0 c. c. 364 de sérum d'anguille, chauffé entre 55 et 56° pendant une demi-heure, dilué dans 3 c. c. 5 d'eau salée (soit 0 c. c. 2 par kil., dose sûrement toxique); rien à noter, sauf, une heure après l'injection, du myosis, plus marqué à gauche; le lendemain l'animal est très bien portant. — 5° Expérience témoin: lapin ♀ de 1820 gr.; injection de la même quantité du même sérum, semblablement dilué, mais non chauffé; la mort a lieu en 2′ ou 2′ 30″ avec les accidents les plus habituels.

1. Cet animal s'est d'ailleurs montré réfractaire à une dose toxique de sérum d'anguille. Le 19 mars, son poids étant de 3 kil. 440, il reçut dans la veine marginale de l'oreille 1 c. c. 4 de sérum, soit 0 c. c. 406 par kil., dose au moins double de la dose sûrement mortelle. Il ne manifesta aucun trouble. On pourrait se demander, étant donnée la faible quantité d'antitoxine que contenait le sang de cet animal, si certains éléments anatomiques, les cellules nerveuses par exemple, n'avaient pas acquis une résistance spécifique. La chose est possible. Mais il faut néanmoins remarquer qu'en éprouvant la valeur de l'antitoxine présente dans le sang de ce lapin, nous avions constaté que 1/100 du plasma sanguin neutralisait à peu près complètement 1/2000 de sérum d'anguille. Il suit de là que, théoriquement, ce plasma pouvait contenir la quantité d'antitoxine nécessaire pour neutraliser 1 c. c. 4 de sérum tonique; il est facile de calculer

Par contre, voici un autre lapin, immunisé du 8 au 14 mai, et qui reçoit le 8 mai, 0 c. c. 05 de sérum ; le 10, une même dose ; le 12, 0 c.c. 1 ; et le 14, 0 c. c. 2, soit en tout 0 c. c. 4. Le 15 mai, on lui fait une saignée comme à l'animal précédent et on prépare les globules rouges de la même façon. On constate que ceux-ci résistent au sérum d'anguille à 1/2000 et même à 1/1000 : de plus, s'il y a destruction de globules par ce sérum à 1/100, 1/200, 1/400 et 1/800, beaucoup d'hématies cependant, contrairement à ce qui se passe avec le sang d'animaux normaux (non immunisés), dont les hématies sont totalement détruites, échappent à cette action dissolvante et se retrouvent dans le fond des tubes à expérience [1]. — Ce fait est particulièrement intéressant ; comme il ne s'observe jamais avec le sang des animaux normaux (non immunisés) auquel on a ajouté du sérum d'anguille à ces doses ci-dessus indiquées de 1/100 à 1/800, il ne paraît pas pouvoir être expliqué par cette supposition que, sous l'influence des injections successives de toxine, les globules les moins résistants ont été détruits ; si le phénomène tenait à une telle cause, à une différence naturelle de résistance entre les globules d'un même animal, il y a des cas où l'on devrait voir de ces globules chez les animaux non immunisés, échapper à l'action dissolvante du sérum d'anguille.

C'est là une constatation analogue à celles qui nous avaient permis de dire dans notre mémoire cité plus haut des *Archives de pharmacodynamie*, que, dans certains cas, l'immunisation aboutit à une modification des propriétés essentielles des globules rouges ; « la résistance de ces éléments augmente

que, pour cela, 28 c. c. d'un plasma doué seulement de l'efficacité sus-indiquée étaient suffisants. La signification d'un pareil calcul peut, il est vrai, être infirmée par l'expérience.

De fait, voici une expérience sur un lapin, où il se trouve justement que le sang de cet animal contenait la même quantité d'antitoxine que celui du lapin précédent et où l'on voit pourtant que l'animal fut incapable de résister à une dose mortelle de sérum. Il s'agit d'un lapin qui reçut en injection intra-veineuse 0 c. c. 1 de sérum d'anguille ; quarante-deux heures après on constata que ses globules sanguins ne diffusaient plus dans une dilution à 1/2000 de sérum d'anguille, c'est-à-dire que son sang contenait une quantité d'antitoxine égale à celle que l'on trouvait dans le sang d'un animal immunisé pendant 4 mois environ. Cependant ce même lapin, ayant reçu dans une veine 0 c. c. 4 de sérum par kil., présenta tous les accidents habituels de cette intoxication, sauf l'hémoglobinurie, et mourut en 1 heure 33'. Remarquons toutefois qu'un animal témoin mourut en 12 minutes à la suite de l'injection d'une dose moitié moindre, soit 0 c. c. 2 par kilogramme.

1. On peut rapprocher ce phénomène de celui tout à fait identique, que nous avons constaté avec le sang des lapins nouveau-nés. Voyez ci-dessous, p. 786

et tend à devenir comparable à celle des globules d'un animal naturellement réfractaire, comme le hérisson » (*loco cit.*, p. 302). On retrouve cette idée très bien mise en valeur dans le mémoire de Tchistovitch : c'est même une des idées maîtresses de ce travail. « Il se passe pendant l'immunisation contre le sérum d'anguille, écrit l'auteur (p. 411), certaines modifications dans les globules rouges, qui ont pour conséquence un surcroît de stabilité; cependant il faut ajouter que les modifications dont il est question ne sont nullement parallèles à l'antitoxicité du sang : loin de là, elles la remplacent au moment où l'antitoxicité au cours de l'immunisation baisse en cédant la place à une immunité pour ainsi dire cellulaire. » C'était aussi une idée à laquelle nous nous étions fortement attachés dans notre travail de 1898. « Le processus d'immunisation, disions-nous, aboutit dans ce cas à une modification dans la constitution des éléments anatomiques qui sont en jeu, telle que cette constitution devient analogue à celle que présentent les mêmes cellules chez les animaux pourvus de l'immunité naturelle... Pour certaines infections ou intoxications, deux modes d'immunité paraissent possibles, l'un qui consiste en la formation dans l'organisme d'une antitoxine et l'autre dans lequel s'ajoutent à ce phénomène des modifications cellulaires profondes. N'est-on pas enclin à penser que cette dernière réaction doit constituer une immunité plus sûre à la fois et plus durable? Ne sait-on pas, en effet, que souvent, dans beaucoup d'infections, l'immunité existe encore, alors qu'il n'y a plus d'antitoxine dans le sang? A ce point de vue, il serait intéressant de rechercher si, au fur et à mesure que se développe l'immunité cytologique, l'immunité humorale ne s'affaiblit pas, si l'antitoxine n'est pas formée en moindre quantité ou même ne disparaît pas » (L. Camus et E. Gley, *loc. cit.*, p. 303).

Chez les deux animaux dont l'observation a été résumée plus haut, comme chez tous ceux sur lesquels nous avons observé les mêmes faits, le sang contenait de l'antitoxine, c'est-à-dire une substance s'opposant *in vitro* à l'action globulicide du sérum d'anguille. Seulement celle qui se trouvait dans le sang du premier était moins active que celle du second.

A ce propos, nous avons remarqué que la quantité ou l'activité de la substance antiglobulicide qui se forme dans l'organisme est moindre chez les animaux soumis à une immunisation

prolongée que chez les animaux rapidement immunisés. Nous n'insistons pas sur ce point : c'est un fait que Tchistovitch a très bien vu (*loc. cit.*, p. 408-409). Telle paraît être la portée de ce fait qu'il conduit à penser que, si l'immunité persiste au cours de ce processus, c'est grâce à la substitution d'une résistance cellulaire à la formation et à l'action d'une antitoxine.

On a vu que nos expériences actuelles ne nous paraissent pas autoriser définitivement cette conclusion et ne nous révèlent point les conditions dans lesquelles peut se réaliser cette substitution. Celle-ci s'opère quelquefois, incomplètement d'ailleurs, puisque nous avons toujours trouvé de l'antitoxine [1] dans le sang des animaux étudiés ; voilà tout ce que nous pouvons dire. En ce sens, il n'y a pas substitution absolue de l'une à l'autre sorte d'immunité : ce que nous avons toujours vu jusqu'à présent en effet, c'est la coexistence de la résistance accrue des globules avec la présence dans le sang d'une certaine quantité d'antitoxine. De nouvelles recherches sont donc à entreprendre à ce sujet.

II. — En raison de l'importance de toutes les données relatives à l'immunité naturelle et eu égard à la pénurie de nos connaissances sur la cause et sur la nature de cette propriété, il importait de chercher s'il n'y a pas d'autres animaux que le Hérisson qui soient réfractaires au sérum d'anguille.

Nous avons fait cette recherche sur diverses espèces, des Batraciens, grenouille (*Rana temporaria* et *esculenta*) et crapaud (*Bufo vulgaris*) ; des Chéloniens, tortue (*Testudo græca*) ; des Oiseaux (poule et pigeon), des Chéiroptères (*Vespertilio murinus*) [2]. Sur tous ces animaux nous avons constaté que les globules rouges, séparés du plasma par la force centrifuge, et éprouvés par le procédé que nous avons décrit dans notre première note à l'Académie des sciences et dans notre mémoire des *Archiv. intern. de pharmacodynamie* (méthode de l'isotonie [Hamburger], procédé de Mosso-Viola), sont très résistants à l'action

1. Il convient de rappeler que, dans ses expériences sur l'immunité contre la ricine, Ehrlich a montré que, au-delà d'un degré déterminé d'immunité et même [illegible] l'immunisation a été prolongée, il est très difficile d'augmenter la résistance (voy. Ehrlich, *Exper. Unters. über Immunität* [*Deuts. med. Wochens.*, 6 août 1891, p. 976]).

2. Il est vrai que, dans cette série d'expériences, nous avons toujours saigné les animaux trop peu de temps peut-être après la dernière injection. Pour cette raison aussi, de nouvelles expériences sont nécessaires pour trancher la question.

dissolvante du sérum d'anguille[1] : celui-ci, même à la dose de 1/100, ne fait pas diffuser l'hémoglobine de ces globules. Comparativement, nous avons vu que le sérum d'aucun de ces animaux ne contient de substance antiglobulicide. C'est donc bien par eux-mêmes, en vertu de leur organisation ou constitution propre, que les hématies de tous ces animaux, comme celles du hérisson, résistent à la toxine du sang de l'anguille. Ainsi l'immunité naturelle, en ce qui concerne la toxine considérée ici, tient à une constitution cellulaire spéciale ; la preuve que de nouveau nous en donnons *in vitro*, par une expérience facile à répéter, est des plus simples et, croyons-nous, des plus claires.

Il serait intéressant de savoir quelle est la résistance des animaux énumérés ci-dessus à la toxicité générale du sérum d'anguille. Tchistovitch dit (*loc. cit.*, p. 407) que les poules sont insensibles à ce poison. Nous avons fait de notre côté des expériences sur le pigeon. Nous en rapporterons quelques-unes : 1° Pigeon de 380 grammes. A 6 h. 2 on injecte dans la veine brachiale 0 c. c. 05 de sérum dilué dans 0 c. c. 5 d'eau salée. 6 h. 9 et 6 h. 12, vomissement. Rien d'autre à noter. Les jours suivants, l'animal se porte très bien. — On remarquera que la dose employée est le double de la dose mortelle pour des mammifères sensibles au sérum d'anguille, et de poids équivalent. En voici la preuve : le même jour, à 6 h. 26, à un cobaye de 740 grammes, on fait une injection dans une veine jugulaire de la même quantité du même sérum. 6 h. 31, dyspnée, parésie avec, par moments, mouvements impulsifs. 6 h. 36, chute sur le flanc. 6 h. 41, arrêt de la respiration. Jusqu'à 6 h. 45 on observe quelques rares respirations agoniques. L'animal est donc mort en 15′ environ. — 2° Pigeon de 350 grammes. A 5 h. 47 injection intra-veineuse de 0 c. c. 1 de sérum dilué dans 1 c. c. d'eau salée. 5 h. 52, vomissement. L'animal se tient affaissé ; il peut cependant se relever, il le fait d'ailleurs spontanément par moments ; il vole aussi très bien. Deux jours après il avait le même poids. Mort accidentelle deux jours plus tard. — 3° Pigeon de 380 grammes. De 6 h. 16 à 6 h. 17, injection

1. Dans une note à l'Académie des sciences (L. Camus et E. Gley, Expériences concernant l'état réfractaire au sérum d'anguille. Immunité cytologique [*Comptes rendus*, CXXIX, p. 231, 24 juillet 1899]) nous avons indiqué les résultats généraux de ces expériences.

intra-veineuse de 5 c. c. d'eau salée contenant 0 c. c. 5 de sérum d'anguille. Un peu d'agitation à la fin de l'injection. 6 h. 19, sécrétion salivaire abondante. 6 h. 21, dyspnée qui paraît tenir à une sécrétion trachéale marquée. 6 h. 25, 74 respirations par minute. 6 h. 35, même dyspnée; la salivation est toujours aussi abondante. 7 h. 15, amélioration; l'animal redevient assez vif. Le lendemain matin, il fut trouvé mort. — Ces faits suffisent pour montrer que la résistance du pigeon à l'action toxique générale du sérum d'anguille est assez considérable.

III. Parmi les animaux dont nous venons de parler, il en est, comme le hérisson, la chauve-souris, dont les globules rouges sont dépourvus de noyau; mais tous les autres possèdent des hématies nucléées. On pouvait se demander si des animaux, habituellement très sensibles au sérum d'anguille, tels que le lapin, n'y seraient pas plus ou moins réfractaires à cette période de leur existence (période fœtale) où leurs globules rouges, pourvus d'un noyau, paraissent avoir une constitution différente de celle des hématies de l'état adulte. Nous n'avons pas fait cette recherche sur des fœtus de lapins, sur lesquels il est assez difficile de se procurer des quantités suffisantes de sang dans de bonnes conditions, mais nous l'avons faite sur des lapins nouveau-nés. Nous avons trouvé que les globules sanguins de ces animaux, dépourvus de noyau, sont très résistants à l'action dissolvante du sérum d'anguille [1]. Nous résumons nos expériences dans le tableau suivant :

Les globules de ces animaux présentent donc une résistance très marquée, puisque ceux du lapin adulte laissent encore diffuser leur hémoglobine dans des dilutions de sérum d'anguille à 1/10000, à 1/15000 et même quelquefois 1/20000, comme nous l'avons montré. Cette résistance ne s'atténue guère jusqu'au 15e jour après la naissance; elle ne paraît offrir que des différences purement dépendantes des individus; vers le 18e jours la diminution est plus appréciable; à partir de ce moment elle s'abaisse en effet rapidement. Remarquons néanmoins que, contrairement à ce qui se passe dans le sang de l'adulte, l'hématolyse, même à ce moment, n'est pas encore totale; il reste dans le fond des tubes à expérience un dépôt globulaire assez volumineux.

1. Nous avons indiqué ce fait dans notre note à l'Académie des sciences, du 24 juillet 1899, citée plus haut.

ANIMAUX		PORTÉES	AGE	POIDS	SOLUBILITÉ DES GLOBULES ROUGES	QUANTITÉ d'antitoxine cont. dans le sérum
N° 1[1].	♀	A	4 jours.	52 gr.	Jusq. 1/400 de sér. d'ang.	Ég. à 10 : 1
2.	♂	B	5 —	70 —	— 1/200 —	0
3. Albinos	♂	C	6 —	82 —	— 1/400 —	0
4.		B	7 —	44 —	— 1/200 —	0
5.		A	8 —	80 —	— 1/400 —	
6.	♂	B	9 —	100 —	— 1/100 —	0
7.		D	9 —	98 —		0
8.		D	9 —	106 —	— 1/400 —	
9.	♂	C	10 —	87 —	— 1/800 —	0
10.	♂	D	16 —	142 —	— 1/400 —	
11[2]. Albinos	♀	A	17 —	183 —	— 1/2000 —	Ég. inf. à 40 : 1
12[3]. —	♂	C	18 —	135 —	— 1/8000 —	0
13[4].	♂	D	25 —	400 —	— 1/8000 —	
14[5].	♀	D	29 —	495 —	— 1/8000 —	

1. La mère avait été immunisée; elle n'avait plus reçu de toxine depuis 9 jours, 4 jours avant sa mise-bas.
2. La mère, qui est celle aussi du n° 1, n'avait plus reçu de toxine depuis 19 jours. Yeux entr'ouverts.
3. La diffusion est très faible. Yeux ouverts.
4. Beaucoup de globules non dissous, même dans la dilution à 1/200 de sérum d'anguille. L'hématolyse est loin d'être totale, comme cela arrive pour les globules de l'adulte.
5. Même remarque.

Ainsi l'immunité naturelle, d'ordre cytologique, peut n'être point permanente, mais au contraire transitoire: elle peut ne pas durer toute la vie de l'être qui la présente, mais seulement une phase de son existence.

Cette immunité naturelle passagère est bien de nature cellulaire; à aucun moment nous n'avons constaté que le sérum de ces animaux fût antiglobulicide. Seuls, les n[os] 1 et 11 avaient un sérum contenant une certaine quantité d'antitoxine, mais ils étaient nés d'une mère immunisée[1].

Ce fait montre que les deux sortes d'immunité, cytologique et humorale, peuvent coexister chez le même animal, comme nous l'avions indiqué dans notre mémoire des *Archiv. de pharmacodynamie* (p. 302-303), et, d'autre part, constitue une preuve de la distinction profonde qui paraît devoir être maintenue entre l'immunité naturelle et l'immunité acquise, au point de vue de leur mécanisme ordinaire.

1. Sur le n° 5, de la même portée, la recherche de l'antitoxine dans le sérum n'a pas été faite.

Sur les microbes thermophiles des sources thermales

PAR Mlle TSIKLINSKY

(De l'Institut bactériologique de Moscou.)

Nous savons aujourd'hui que les microbes thermophiles sont largement répandus dans la nature. Leurs germes se trouvent dans le sol, dans l'eau, dans l'air, dans la neige nouvelle, etc., mais surtout dans les eaux thermales qui, chaudes, riches en sels minéraux, peuvent présenter à leur sortie du sein de la terre un milieu nutritif comparativement riche aux organismes inférieurs.

La haute température de certaines sources n'est pas un obstacle. Flourens a signalé en 1846 une algue vivant dans une source à 98°. Puis Brewer trouva dans un geyser à 83° des formes Nostoc. Ehrenberg observa tout un enchevêtrement d'algues vertes et rouges dans des sources thermales de l'île d'Ischia, à des températures de 63°-65°, supérieures à celles de la vie de la plupart des autres êtres [1].

Ehrenberg a aussi observé, dans des eaux à 65°-68°, toute une série d'êtres vivants d'une organisation relativement supérieure, comme par exemple des mollusques, des arthropodes et des vers, et des constatations analogues ont été faites maintes fois par d'autres savants : des grenouilles et des poissons pourraient même vivre au-dessus de 55°.

Il est pourtant prudent de ne pas accepter ces données comme certaines. Des erreurs de température sont possibles. Souvent, les algues ne vivent pas dans l'eau de la source elle-même, mais sur ses bords, où la température n'est pas la même que dans l'eau. D'autre part, Hoppe-Seyler a vu dans une source à 55°, près de Bahaglia, des bandes de petits poissons, circulant rapidement dans toutes les directions. On aurait pu croire qu'ils supportaient en effet une température aussi élevée, tandis qu'en

1. Toutefois, il est bon de noter que ces températures élevées sont des *températures-limites :* d'après les observations faites, c'est la température de 55° qui se montrerait la plus favorable à la végétation des sources thermales.

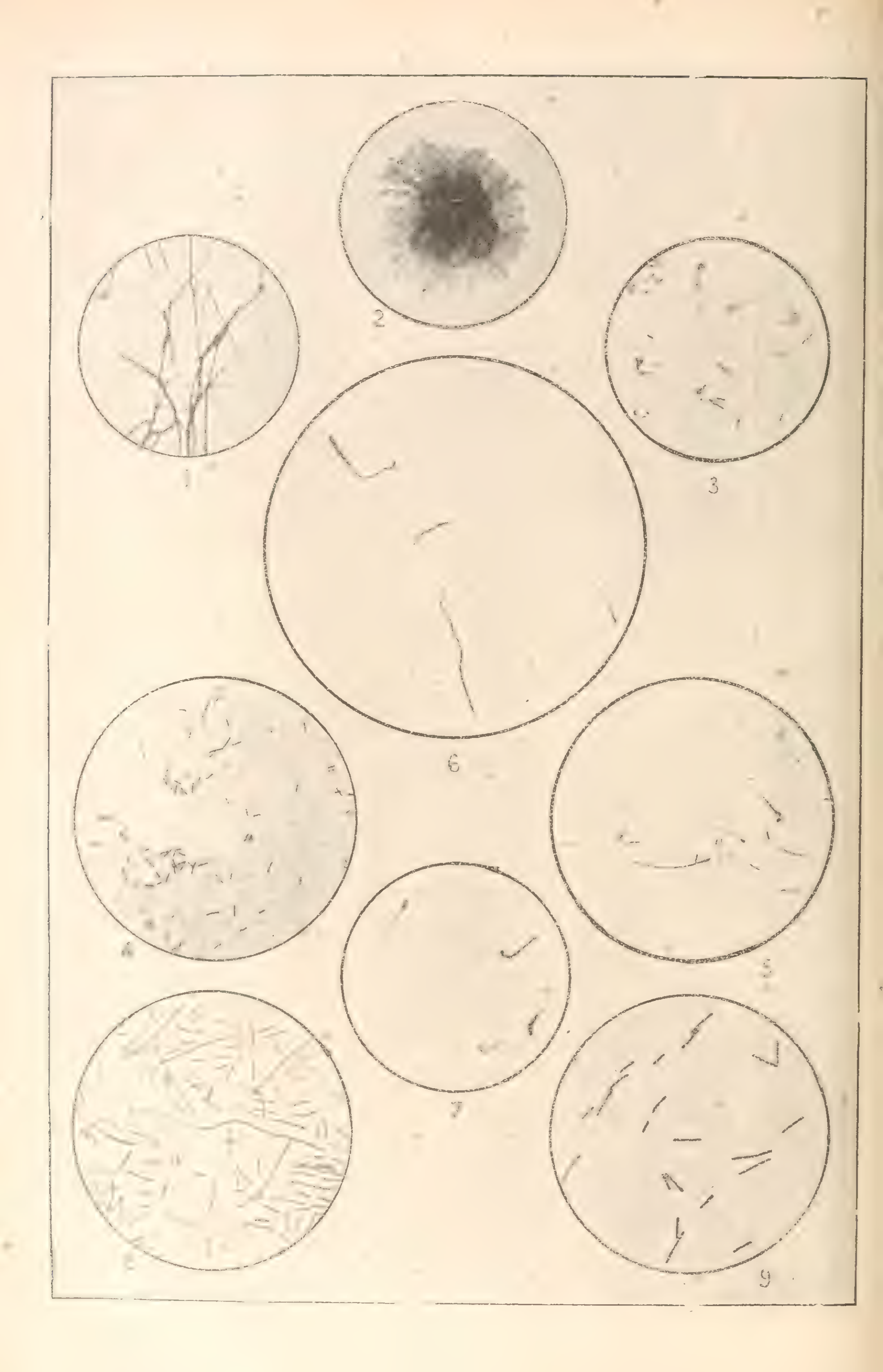
réalité l'eau qu'ils habitaient était une eau à 25° seulement, surnagée par des couches plus chaudes. Ceux d'entre eux qui se risquaient du côté de la surface n'échappaient à la mort que par une prompte fuite.

Toutefois, s'il peut y avoir quelque hésitation au sujet de la présence dans les sources thermales d'animaux élevés en organisation, il n'y en a pas au sujet des microbes, dont un certain nombre ont été décrits par MM. Certes et Garrigon, Karlinsky et Teich, comme nettement thermophiles : ce sont cinq espèces de bacilles, dont trois furent trouvées dans les eaux de Bosnie (51°-58°) et deux dans les eaux de Luchon, au sud de la France.

En raison du grand intérêt qu'offre l'étude de la population des eaux thermales, j'ai profité très volontiers de l'amabilité de M. le professeur Ogneff[1], qui a mis à ma disposition plusieurs échantillons d'eaux thermales de l'île d'Ischia, provenant de trois sources différentes : on prit deux échantillons de chaque. La température de ces trois sources était de 43°, de 51° et de 73°.

Une analyse préalable ayant montré que le nombre des germes de microbes thermophiles était faible partout, j'ai ensemencé dans du bouillon quelques gouttes de chacun des échantillons. Sur six tubes ensemencés, trois présentèrent déjà, dès le lendemain, un trouble : le quatrième ne se troubla qu'au bout de trois jours et les deux derniers restèrent stériles. De toutes ces cultures, je fis des plaques de gélose, et j'ai pu isoler ainsi six espèces de microbes thermophiles, qui tous se ressemblent d'après certains caractères morphologiques et biologiques. Ce sont tous des bâtonnets immobiles, se colorant par toutes les couleurs d'aniline et par la méthode de Gram. Tous sont des aérobies, car, ensemencés dans la gélose sucrée, d'après la méthode de Liborius, ils ne se développent qu'à la surface de la gélose. La plupart d'entre eux ont pour optimum de croissance 60°, bien que tous croissent encore à 70°. Le fait qui mérite surtout l'attention, c'est que tous ces microbes, sauf un seul, ne sont pas capables de se développer à 37° et au-dessous, de sorte que nous avons le droit de les classer parmi les microbes thermophiles absolus.

1. Je prie M. le professeur Ogneff de vouloir bien accepter ici l'expression de ma sincère reconnaissance à ce sujet.



1
2
3
4
5
6
7
8
9

Je passe maintenant à la description de tous ces microbes en détail.

Bacille n° 1. — De la source à 51°, on isola un microbe présentant à côté de très longs filaments non ramifiés des bâtonnets relativement courts ; pas de spores (fig. 1) : colonies très épaisses au centre, s'amincissant vers la périphérie en forme de pétales multiples (fig. 2). C'est sur la gélose simple et glycérinée que ce bacille végète le mieux ; il en couvre toute la surface et ne s'en détache que difficilement.

L'addition du sucre agit défavorablement. Dans du bouillon il végète plus abondamment et ne pousse point sur la pomme de terre. Il ne liquéfie pas la gélatine. On n'a pas constaté d'amylase ni de sucrase. Je nommerai ce bacille *bacillus thermophilus filiformiis.*

Bacille n° 2. — On isola du même échantillon d'eau un court bâtonnet immobile, poussant rapidement sur les milieux nutritifs solides. Les spores sont placées presque à l'extrémité des bâtonnets, à petite distance du bout, qui alors paraît pointu. (Fig. 3.) Il végète bien sur tous les milieux nutritifs solides et liquides, la pomme de terre seule exceptée.

C'est dans la gélatine qu'il pullule le plus abondamment ; il ne la liquéfie pas et, généralement, ne manifeste la présence d'aucune diastase. Bien que l'optimum de sa croissance soit de 58°-60°, il pullule encore bien à 69°-70° ; mais ses caractères morphologiques changent à cette dernière température : le bâtonnet ne donne plus de spores. (Fig. 4.) Réensemencé à 58°-60°, il forme de nouveau des spores. Ce bacille garde ces derniers caractères morphologiques également à 37°, mais dans ce dernier cas le développement n'est appréciable qu'au bout de 15 jours, tandis que, à sa température de prédilection, il apparaît en abondance en moins d'un jour. On n'a point observé de développement à la température de la chambre pendant un temps très long. Il se colore bien par toutes les couleurs d'aniline ; dans les spores on ne voit se colorer que la bordure.

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus par des recherches faites sur l'eau de la source Castiglione, ayant une température de 73°.

En ensemençant dans du bouillon à 58° quelques gouttes de cette eau, on n'eût qu'au bout de 3 jours une culture présen-

tant une grande variété de formes microbiennes (fig. 5, 6 et 7) rappelant les formes d'involution des bactéries, fait qui fut confirmé plus tard par des expériences. En effet, une culture en bouillon, obtenue avec cette même eau, mais à 70°, ne donna plus cette variété de formes, observée à 58°, mais bien des formes bacillaires ordinaires, et encore plus rapidement qu'à 58°, en moins de douze heures. On a retrouvé le même fait avec les bacilles, 3 et 4 isolés de cette source, qui tous deux pullulent à 70° plus rapidement qu'à des températures plus basses, et y ont une croissance normale, tandis qu'à 58° ils donnent toujours des formes d'involution. Ce sont donc des bacilles thermophiles dans le sens absolu du mot.

Bacilles nos 3 et 4. — (Fig. 8 et 9). Ces deux bacilles se ressemblent beaucoup : ce sont des bâtonnets immobiles, qui croissent bien sur tous les milieux nutritifs, et forment dans le bouillon une pellicule superficielle épaisse et glaireuse.

L'optimum de la croissance est près de 68°. Seulement l'un d'eux croît bien encore à 71°, coagule et digère le lait à 55°-58°, et, à 58°, donne plus vite des formes d'involution que l'autre. L'autre ne sécrète aucune diastase, et à 70° ne donne plus que des traces de croissance. De plus, les colonies du premier bâtonnet sont assez massives et épaisses au centre, et on ne peut en discerner la structure à l'aide d'un faible grossissement, tandis que celles du second sont transparentes, uniformément minces et ondulées.

Bacille n° 5. — Je ferai encore mention d'un microbe termophile, isolé de la source à 51°. Ce microbe est un court bâtonnet, qui ne forme pas de spores. L'optimum de sa croissance est de 58°, mais il croît aussi bien à 37° ; au-delà de 69° il ne se développe point. Il pousse sur tous les milieux nutritifs, sauf sur pomme de terre. Il possède une diastase protéolytique.

De cette même source j'ai isolé un microbe très ressemblant par tous ses caractères (pellicule sur bouillon, enduit sur pomme de terre, etc. au *bacillus subtilis* ordinaire. Néanmoins ce microbe croît très bien à 57°, et par ce fait peut être classé au nombre des microbes thermophiles facultatifs. En le comparant avec une culture de *bacillus subtilis* du laboratoire, je pus me convaincre de la complète identité de leurs caractères morphologiques et biologiques, et constater aussi, à mon grand étonnement, que

notre *bacillus subtilis* se montrait capable de pousser aussi à 57°, moins abondamment, il est vrai, qu'à 37°.

Ainsi, je trouvais un bacille thermophile non dans une source thermale, mais dans une culture rajeunie au laboratoire pendant bien des années. Ce fait avait pour moi un intérêt capital, parce que, dans un premier travail, j'avais essayé d'élucider autant que possible la question des rapports entre les microbes thermophiles et les autres microbes.

Les microbes thermophiles forment-ils des groupes autonomes, sans aucun rapport avec les microbes ordinaires? Ou bien ceux-ci peuvent-ils, sous l'influence du milieu, acquérir provisoirement ou pour toujours, des propriétés de microbes thermophiles ?

Tous les expérimentateurs, M. Cohn le premier, ont toujours admis que le *bacillus subtilis* ne croît pas au-dessus de 50°, et qu'à cette dernière température, sa croissance est à peine observable. Un grand nombre de savants ont eu affaire avec le même *bacillus subtilis*. L'existence d'une autre variété du même bacille, variété qui peut pousser à 57°-58°, m'a fait me demander si, en changeant les conditions d'existence du *bacillus subtilis* ordinaire, on ne réussirait pas à en faire une variété thermophile.

En effet, par des ensemencements successifs, j'ai réussi à renforcer considérablement les propriétés thermophiles du *B. subtilis* de notre laboratoire. Au début, comme il a été dit plus haut, ce bacille se développait à 57°, mais faiblement : l'enduit qu'il formait à la surface de la gélose était très mince, et, au microscope, on voyait beaucoup d'individus morts. Quelques réensemencements successifs amenèrent un changement notable ; à la 10e génération on obtint déjà une plus abondante croissance sur la gélose, et le nombre des individus morts fut de beaucoup moindre que celui de la culture de départ.

Cette adaptation à une température graduellement élevée est cependant pénible, et doit être étroitement surveillée. Ainsi, ce microbe, qui, à sa trentième génération, croissait abondamment à 58°, cessait complètement de se développer à 58°,5.

Malgré cela j'espère pouvoir, en élevant lentement et graduellement la température des cultures, atteindre une température beaucoup plus élevée que la précédente.

Ce qui me confirme dans cet espoir, ce sont les résultats que

Dallinger a obtenus dans la même direction, avec même certains infusoires flagellés. La température normale de la vie de ces animalcules est de 15°, 5. En élevant graduellement et lentement la température du milieu de culture, Dallinger arriva à la porter à 23°. Mais, à ce niveau, la sensibilité des infusoires devint extrême : une différence d'un quart de degré dans la température produisait sur eux un effet nuisible, et il fallut des mois pour déterminer l'accoutumance aux hautes températures. qu'on poussa cependant jusqu'à 70°.

Très intéressants aussi sont les résultats que M. Davenport tira de ses expériences sur les têtards des crapauds. Il ne réussit, il est vrai, qu'à élever de 3°, 5, la température maxima du développement de ces animaux, mais il s'agissait ici d'animaux polycellulaires, représentants d'êtres d'une organisation élevée. La température de 40°, 5, était en moyenne celle à laquelle les têtards élevés dans des conditions normales, c'est-à-dire à environ 15°, tombaient à l'état de rigidité. Dans le cas où les têtards étaient préalablement élevés pendant 4 semaines à une température de 25°, la température de rigidité s'élevait également, mais en proportion bien moindre, à savoir : de 3°, 5 seulement. L'influence de cette culture à 25° se conservait pendant un temps comparativement long, et persistait après même qu'on les avait ramenés à des températures plus basses.

De plus, Davenport signale que la cause d'une semblable adaptation ne peut être attribuée à une sélection artificielle, puisque tous les têtards cultivés à température élevée sont restés vivants. Par conséquent, c'est aux changements particuliers survenus dans leur protoplasma qu'il ramène leur très grande stabilité par rapport à la température.

Davenport admet même que c'est grâce à la diminution de la quantité d'eau du protoplasma que la vie devient possible à une température très élevée. A l'appui de cette opinion viennent certaines observations de M. Dallinger sur la structure du protoplasma des infusoires, dans le cas où on les cultive à des températures relativement hautes. Les vacuoles deviennent plus nombreuses, puis disparaissent graduellement, et l'eau qu'elles renfermaient s'élimine de l'organisme. Ce n'est qu'à la fin de ce processus que les infusoires pourront être soumis à l'action d'une température supérieure. D'un autre côté on sait que l'albu-

mine se coagule à une température d'autant plus élevée qu'elle contient moins d'eau. Il en est de même pour les diastases. Davenport en revient donc à l'idée, plusieurs fois émise, d'attribuer la résistance de certaines espèces à la chaleur à la même cause que celle à laquelle on attribue la résistance des graines et des spores. On peut objecter que la graine et la spore sont à l'état de repos, tandis que les microbes thermophiles ont, à des températures relativement élevées, une activité végétative supérieure à celle que manifestent les microbes ordinaires aux températures coutumières. Il y a tant de causes différentes qui peuvent expliquer, en dehors de la diminution de la proportion d'eau, la résistance du protoplasma à la coagulation par la chaleur, qu'il faut ne se fier à aucune hypothèse, tant qu'elle n'est pas appuyée sur des faits. Celle que je discute n'a encore aucune base, et je n'ai qu'à la signaler comme une explication plausible, mais non encore démontrée.

BIBLIOGRAPHIE

Hoppe-Seyler. *Arch. f. die gesammte Physiologie*, 1875.

Brewer. *Americ. Journ. of science and arts*. V. 41, p. 373, 1866.

Flourens. *Comptes rendus*. T. XXII,I p. 934.

Sonnerat. Observation d'un phénomène singulier sur des poissons qui vivent dans une eau qui a 69° de chaleur. *Journal de Physique*, III, p. 256, 1774.

Dallinger. *Journal of the Royal Micr.* Soc. III, p. 1-15, 1880.

Ibid. *The Presidents address*. XI, p. 97-103, 1887.

Ehrenberg. *Monatsber. K. P. Acad. Wiss.* Berlin, 1858, p. 488-495.

De Blainville, 1824. Art. *Mollusques* dans le *Dict. des sciences naturelles*. T. XXXII, p. 141.

Plateau. Recherches phys. sur les articulés aquatiques, 2e partie. *Bull. Acad. roy. Sci. Belg.* XXXIV, p. 274-321.

Spallanzani. *Opuscules de physique animale et végétale*. Trad. p. J. Senebier. 5 vs. 1777.

De Saussure. *Voyages dans les Alpes*. T. I-III, 1796.

Sachs. *Flora*. XXVII, p. 5-12. 1864.

Davenport and Castle. *Arch. Entwickelungs-mechanik der Organismen*, II, 2. S. 227, 1895.

Certes et Garrigou. *Comptes rendus*. T. CIII, p. 703.

Jeich. *Hygienische Rundschau*. 1896, 16.

Karlinsky. *Ibid*. 1895. 15.

SUR L'ISOMALTOSE

PAR M. LE Dr POTTEVIN.

Depuis que les travaux de Fischer ont paru établir que le dextrose, traité par l'acide chlorhydrique concentré, donnait naissance à des produits de condensation parmi lesquels figurerait un di-glucose isomère du maltose, « l'isomaltose », celui-ci a été trouvé un peu partout : Scheibler et Mittelmeier l'ont découvert dans les glucoses industriels; Lintner et Düll l'ont isolé des produits de la transformation de l'amidon par l'amylase. L'opinion de Fischer en ce qui concerne l'identité du diglucose obtenu par lui a été combattue de divers côtés, et lui-même ne la considère pas comme absolument établie. car il dit dans son mémoire de 1895 :

« La preuve formelle que l'isomaltose soit un corps chimiquement pur manque encore.

« ... Pour asseoir une conclusion ferme sur la nature de l'isomaltose, il n'y a d'autre moyen que de préparer le produit à l'état pur; j'ai abandonné cette tâche parce que la préparation d'une quantité de produit brut suffisante pour permettre la purification serait trop pénible et trop coûteuse. » L'opinion de Lintner et Düll qu'une substance définie ayant les propriétés de l'isomaltose existerait parmi les produits de la saccharification de l'amidon par l'amylase, soutenue par quelques savants, Schifferer, Hiepe, Prior... a été combattue par d'autres, en tête desquels il convient de citer Brown et Morris.

Les raisons invoquées par Lintner et Düll sont les suivantes :

Si on pousse aussi loin que possible les fractionnements par l'alcool du mélange fourni par une saccharification arrêtée au début, la portion soluble dans l'alcool fort possède un pouvoir rotatoire et un pouvoir réducteur qui ne sont pas ceux du maltose; le sucre qu'elle contient ne cristallise pas (de même que l'isomaltose de Fischer); il est attaqué par la levure de bière, mais il est détruit bien plus difficilement que le maltose (l'isomaltose de Fischer serait complètement inattaquable par la

levure et par ses diastases); traité par l'acétate de phénylhydrazine, il fournit une osazone cristallisée identique à l'isomaltosazone de Fischer.

Comme celle de la maltodextrine, la préparation de l'isomaltose est délicate, incertaine, et les propriétés du produit auquel elle conduit varient avec les expérimentateurs. Comme constantes du produit pur, Lintner et Düll indiquent :

Pouvoir rotatoire............	140,6
Pouvoir réducteur...........	0,84 de celui du maltose.

Brown et Morris font observer avec raison que ces nombres sont en contradiction avec la règle formulée par O'Sullivan et par eux, ce qui donnerait à penser que la substance appelée « isomaltose » ne contenait pas exclusivement des produits de transformation de l'amidon : les savants anglais ont préparé d'après les indications de Lintner un produit qu'ils considèrent comme correspondant à l'isomaltose : ils lui assignent les constantes suivantes :

Pouvoir rotatoire...............................	140,6
Pouvoir réducteur (celui du dextrose étant 100)...	56,03

Lintner et Düll disent que l'isomaltose ne cristallise pas : Ling et Baker ont obtenu, en partant de solutions d'isomaltose préparées selon leur méthode, des cristaux ayant l'aspect des cristaux de maltose. Il est en fait extrêmement difficile d'obtenir du maltose cristallisé en partant des produits fournis par une saccharification commençante, mais on sait bien aussi que l'addition de dextrines ou de substances analogues à des solutions de glucose ou de maltose rend la cristallisation difficile et même pratiquement impossible ; on ne se croit pas pour cela en droit de conclure que le sucre qu'elles contiennent a été transformé et est devenu incristallisable.

L'isomaltose est moins facilement attaquable par la levure que le maltose : mais les nombres fournis par Brown et Morris montrent que : 1° la levure n'attaque pas l'isomaltose en bloc, et si on regarde ce qu'est le produit avant et après la fermentation, on voit que tout se passe comme si, dans un mélange de maltose et de dextrine, une certaine quantité de maltose avait

disparu : 2° l'isomaltose ne dialyse pas tout d'une pièce, les portions qui passent les premières sont les plus riches en sucre ; 3° la transformation de l'isomaltose en maltose s'accompagne d'une augmentation de poids qui correspond aussi exactement qu'on peut le désirer à celle qui doit accompagner la saccharification de la dextrine qu'il contient, si on le considère comme un mélange. On le voit, Brown et Morris ont fait pour l'isomaltose à peu près ce que j'ai fait (*ces Annales*, p. 728) pour la maltodextrine, et il ne reste plus en faveur des idées de Lintner que l'argument tiré de l'identification des osazones.

Les solutions de maltose et d'isomaltose traitées dans les mêmes conditions par l'acétate de phénylhydrazine à chaud laissent précipiter par refroidissement des osazones cristallisées nettement différentes.

La maltosazone cristallise en belles aiguilles jaunes, isolées ou groupées en faisceaux radiés, ce sont de gros cristaux fondant à 206°; leur composition correspond à la formule $C^{24}H^{32}Az^{4}O^{9}$.

L'isomaltosazone cristallise en toutes petites aiguilles réunies en grumeaux : elle fond aux environs de 150°; sa composition est la même que celle de la maltosazone.

Les différences relevées entre les osazones ne suffiraient pas à prouver l'existence de deux sucres distincts ; c'est l'opinion de Fischer, car il dit : « nous sommes d'accord avec Brown et Morris pour reconnaître que l'examen des osazones est d'un secours douteux ; une faible trace d'impureté suffit pour altérer le caractère d'une osazone ; ainsi, si on fait cristalliser de la maltosazone avec la moitié de son poids d'isomaltosazone, elle se trouve modifiée au point d'être méconnaissable. » Il y a plus : dans le mémoire que j'ai déjà cité, Brown et Morris établissent qu'il suffit de faire cristalliser la maltosazone avec des proportions de plus en plus élevées d'impuretés pour lui imprimer les modifications qui la conduisent progressivement à l'état d'isomaltosazone ; il m'a semblé pourtant que leur expérience n'était pas topique. L'impureté dont se servent Brown et Morris est la solution obtenue en traitant par l'acétate de phénylhydrazine les produits séparés par l'alcool fort du mélange fourni par une saccharification arrêtée à son début ; si l'isomaltose existait, il y aurait de l'isomaltosazone dans cette

« impureté » et il pourrait ne s'être produit dans l'expérience citée rien autre chose que le phénomène signalé par Fischer dans la cristallisation de la maltosazone en présence d'isomaltosazone. J'ai pensé que je compléterais utilement les recherches de Brown et Morris et que je présenterais un résultat plus démonstratif, si j'obtenais les modifications d'osazone qu'ils ont observées, en mélangeant au maltose des dextrines obtenues ainsi que je l'ai indiqué, en dehors de toute formation de produits réducteurs.

J'ai fait des solutions contenant 5 0/0 de maltose pur cristallisé et des proportions variables d'une dextrine non réductrice soluble dans l'alcool à 70 0/0. 50 c. c. de chacune de ces solutions étaient traités à l'ébullition par 5 grammes de chlorhydrate de phénylhydrazine et 7gr,5 d'acétate de soude : les mélanges maintenus au bain-marie bouillant pendant deux heures n'ont laissé déposer à chaud aucune substance cristallisée ; par refroidissement elles ont donné des précipités cristallins dont j'indique ci-dessous le poids : les points de fusion et les formes cristallines se rapportent aux osazones purifiées par des cristallisations dans l'eau.

Dextrine présente dans le liquide qui contient 1 de maltose.	Poids d'osazone obtenu.	Quadrant correspondant de la figure.	Point de fusion.
5	Pas de dépôt cristallin.		
2	0g,9	I	154°
0,5	2,0	II	174°
0	2,1	III	206°



Nous voyons que l'addition d'une proportion, même faible, de dextrine conduit à une osazone possédant non plus les caractères de la maltosazone, mais bien ceux de l'isomaltosa-

zone : d'autres dextrines plus solubles dans l'alcool produiraient probablement le même résultat à doses plus faibles, car pour l'obtenir avec des dextrines moins solubles dans l'alcool, il faut ajouter celles-ci à doses plus fortes ; l'argument tiré, en faveur de l'isomaltose, de l'observation des osazones est donc caduc ; remarquons en outre que, pour des proportions convenables de maltose et de dextrine, nous n'obtenons pas d'osazone cristallisable : cela nous explique que Brown et Morris n'en aient pas obtenu avec la maltodextrine.

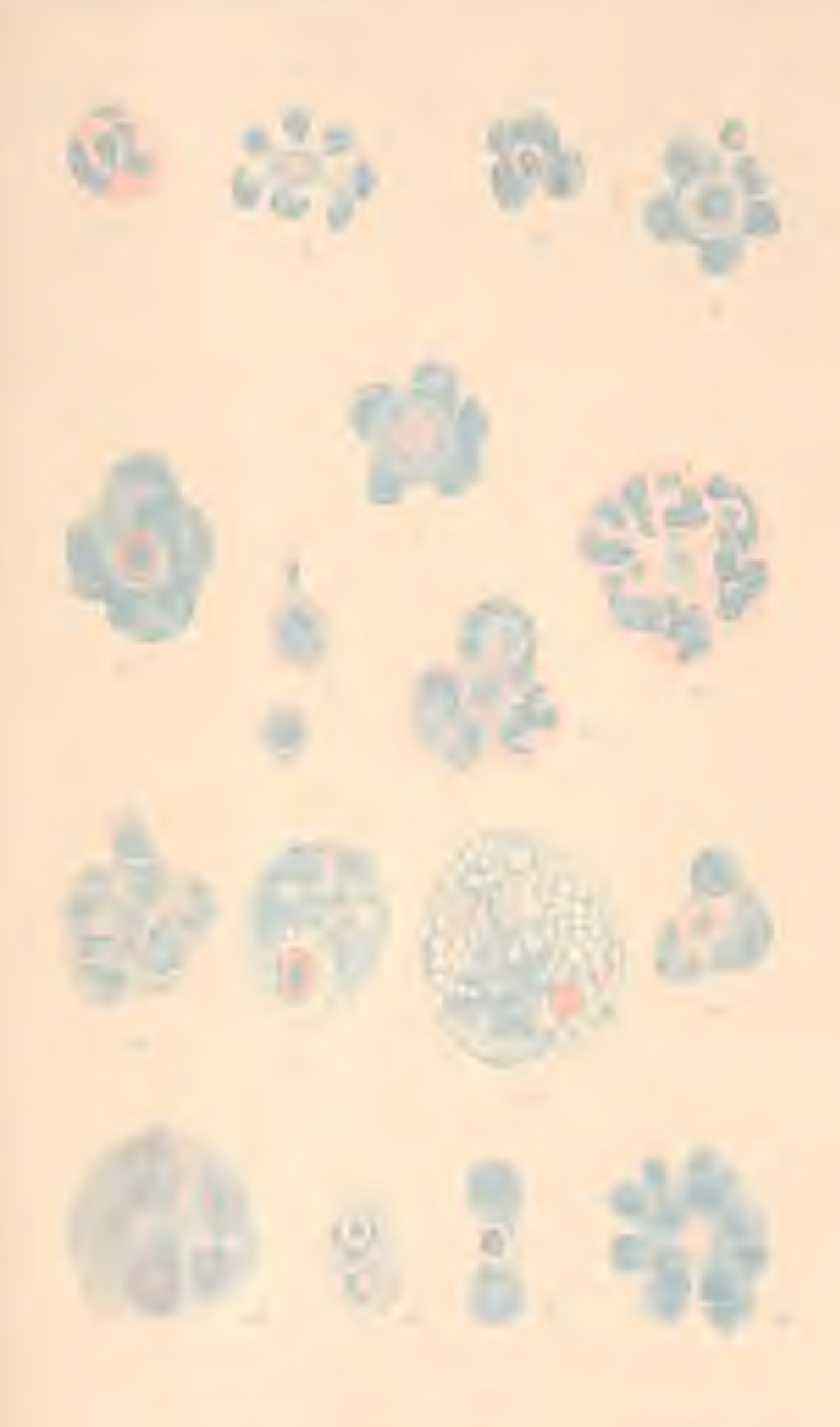
Toutes les expériences de Brown et Morris antérieures à celles sur les osazones, concourent à faire considérer l'isomaltose comme un mélange de maltose et dextrine, et pourtant les savants anglais ne poussent pas jusque-là leurs conclusions : ils le considèrent comme un mélange de maltose et de maltodextrine : cette manière de voir est une conséquence de la façon dont ils ont reproduit l'isomaltosazone avec un mélange qui contient, à côté du maltose, une substance classée isomaltose par Lintner, maltodextrine par eux-mêmes ; nous pouvons maintenant faire le pas qu'ils n'ont pas fait, et conclure que les données expérimentales pour l'explication desquelles on avait eu recours à l'hypothèse de l'isomaltose s'expliquent très bien si on les rapporte aux propriétés d'un mélange de maltose et d'une dextrine convenablement choisie.

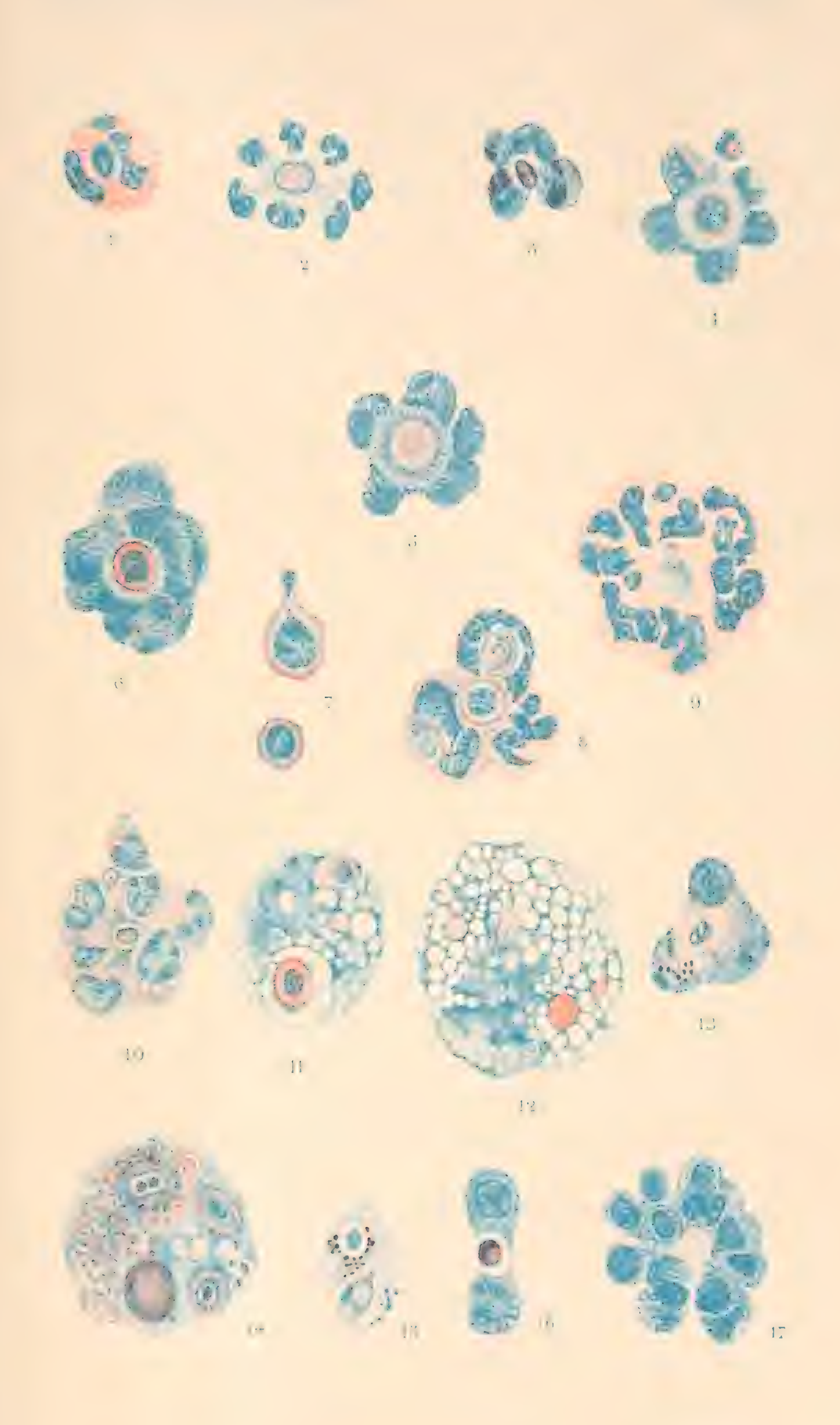
Nous pourrions reprendre la discussion précédente à propos de toutes les dextrines réductrices décrites par les divers auteurs : comme la maltodextrine et l'isomaltose, elles n'ont qu'une existence conventionnelle et on peut s'en tenir pour l'explication du phénomène de la saccharification à la conception simple de O'Sullivan : il se forme exclusivement du maltose et les dextrines non réductrices.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.







V. Roussel, lith.

imp. L. Lafont

13me ANNÉE NOVEMBRE 1899 N° 11

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

LA CONSTITUTION DU POISON DIPHTÉRIQUE

PAR THORVALD MADSEN.

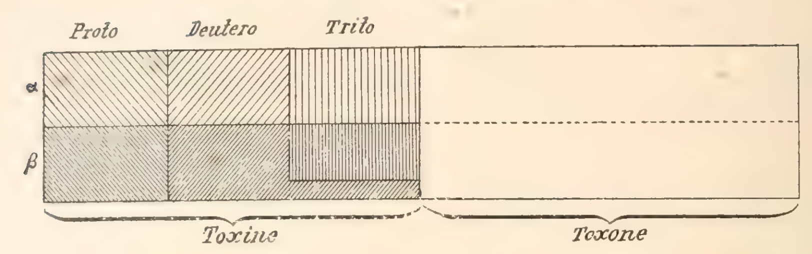
DEUXIÈME PARTIE

(Travail du laboratoire de bactériologie médicale de l'Université de Copenhague.)

Dans un premier mémoire (p. 568 de ce volume), j'ai exposé les idées d'Ehrlich sur la constitution du poison diphtérique, et indiqué la méthode de mesure proposée et inaugurée par ce savant.

Dans son application, cette méthode présente pourtant beaucoup de difficultés. Elle est basée sur la détermination directe et indirecte de la dose minima mortelle pour cobayes de 250 gr. Or, s'il n'est pas aisé de déterminer cette dose pour le poison seul, à cause de nombreuses circonstances encore mal connues, la chose devient encore beaucoup plus difficile pour les mélanges plus ou moins saturés. Aussi le nombre des poisons qu'on a pu examiner jusqu'à présent avec suffisamment d'exactitude pour en suivre les changements de constitution est-il encore très restreint.

Se basant sur l'ensemble des faits connus jusqu'à présent, M. Ehrlich croit pouvoir préciser la formation et la destruction des différents éléments du poison diphtérique de la façon suivante :



Le bacille diphtérique en culture dans du bouillon produit deux substances différentes : des *toxines* et des *toxones* qui, toutes les deux, fixent l'antitoxine. (Pour trois poisons examinés à l'état frais, il a été constaté que ces deux substances s'y trouvaient dans les mêmes proportions.) Les *toxines* peuvent être subdivisées en trois groupes de produits qui diffèrent entre eux par *le degré de leur affinité* pour l'antitoxine, les *prototoxines*, les *deutérotoxines* et les *tritotoxines*, dont les premiers possèdent le plus, les derniers le moins d'affinité pour l'antitoxine ; mais tous en ont plus que les *toxones*.

De plus, il faut supposer que la toxine et chacun de ses produits de transformation se composent de deux modifications α et β à affinités égales pour l'antitoxine, mais qui diffèrent entre elles par leur degré de stabilité. Certains de ces produits résistent mieux que d'autres à l'action du temps et d'autres agents de destruction.

De ces deux modifications, l'une, *la modification α, se transforme très facilement pour toutes les trois toxines en toxoïde ;* cette transformation commence déjà pendant la formation du poison à l'étuve.

Les prototoxines, deutérotoxines et *tritotoxines* de la *modification* β de la toxine se distinguent aussi entre elles par leur degré de stabilité. La tritotoxine serait la moins stable, elle se transforme quelquefois déjà à l'étuve en tritotoxoïde. La transformation n'est pourtant, dans ce cas, jamais complète : il reste toujours de la toxine non transformée, à peu près dans la proportion de 3 pour 7, 2 pour 8 ou 1 pour 9. M. Ehrlich croit voir dans la stabilité relative de cette toxine l'indice de propriétés analogues à celles qui caractérisent les *deutérotoxines*.

La *prototoxine* est beaucoup plus stable, elle ne se transforme en toxoïde correspondant qu'après une conservation de plusieurs mois.

La modification β de la *deutérotoxine* est très stable, elle ne varie pas pendant des années, quand on conserve le poison diphtérique avec les précautions nécessaires.

La *transformation plus ou moins complète des toxines en toxoïdes n'entraîne avec elle aucune modification dans le degré d'affinité de l'ensemble pour l'antitoxine.*

Tous ces faits s'expliqueront très bien quand on aura admis, en plus, que dans chaque équivalent du *poison diphtérique, il y a deux groupements atomiques indépendants*, dont l'un, le groupement *haptophore*, possède *des propriétés exclusivement fixatrices*, et dont l'autre, le groupement *toxophore*, possède *des propriétés toxiques* et produit les effets spécifiques du poison, quand il vient à être fixé sur la cellule sensible par l'intermédiaire du groupement haptophore.

Les *toxones* possèdent des propriétés analogues et subissent les mêmes transformations que les toxines. Le groupement haptophore des toxones présente très probablement beaucoup d'analogie avec celui des toxines, tandis que le groupement toxophore est ici beaucoup plus faible et produit des effets différents.

La présence d'une certaine quantité de toxones dans un poison déterminé est donc coordonnée à la quantité de toxine, et n'est pas subordonnée à celle des toxoïdes; ou, en d'autres termes, la formation des toxones est parallèle à celle des toxines; mais tandis que la quantité des toxines est toujours inversement proportionnelle à celle des toxoïdes, il n'y a aucune proportionnalité entre les quantités des toxones et celles des toxoïdes (c'est pour cette raison que M. Ehrlich a trouvé préférable de donner le nom de *toxones* aux produits qu'il a appelés *épitoxoïdes* dans son premier mémoire).

En effet, les toxones sont sécrétées par les microbes en même temps que les toxines, et leur formation est terminée à la sortie de l'étuve, tandis que les toxoïdes se forment principalement dans les bouillons de culture filtrés, aux dépens de la toxine. Il faut noter aussi que M. Ehrlich a pu constater une diminution de la quantité des toxones.

II

Ainsi que je l'ai déjà mentionné plus haut, mes recherches portent sur quatre poisons différents : A, B, C et D.

En déterminant les constantes, je me suis efforcé d'exprimer leurs valeurs par rapport au nombre 200, c'est-à-dire par des nombres correspondants au nombre de 200 unités fixantes adopté par M. Ehrlich comme base de sa théorie, — sans toutefois dépasser les limites d'exactitude des expériences.

Poison B.

La dose minima mortelle (T) du poison B était, au commencement de l'année 1896, d'environ 0,02 c. c. 1/10 d'une unité immunisante en neutralisant 0,26 c. c.

Cette relation entre la toxine et l'antitoxine est restée la même pendant les deux années suivantes, tandis que la toxicité s'est beaucoup affaiblie en même temps.

TABLEAU I[1]

DATE	0,1 (I) + x C. C. DE POISON	RÉSULTAT
	x	
16/10 97	0,26	— (Infiltr. très faible.)
	0,28	— (Infiltr. grande).
8 '3 98	0,24	0
	0,26	0
	0,28	—

1. Pour toutes les expériences qui suivent, il a été employé exclusivement des cobayes pesant exactement 250 grammes.

0 indique que l'animal a survécu à l'expérience *sans* œdème.

indique que l'animal a survécu à l'expérience *avec* œdème.

† indique la mort de l'animal.

⊙ indique une réaction impossible à constater au toucher sur l'animal vivant, mais relevée à l'autopsie

Pour déterminer la valeur L_0, c'est-à-dire trouver aussi exactement que possible le point de neutralisation de la toxine par l'antitoxine, il est très important de sacrifier un certain nombre d'animaux 4 jours après l'injection. On trouve alors fréquemment, au point d'inoculation, des exsudats ou des hyperémies impossibles à constater au toucher ; mais qui indiquent que le mélange injecté n'était pas complètement neutre.

TABLEAU II

Printemps 1898.

DOSE EN C. C.	RÉSULTAT	DOSE EN C. C.	RÉSULTAT
0,020	*	0,050	† 10
0,024	*	—	† 4
0,035	*	—	† 4
		—	† 3 1/2
0,040	*	—	† 3 1/2
—	† 6		
—	† 5	0,055	† 3 1/2
—	† 4		
—	† 4	0,060	† 3
		—	† 3
0,045	† 6	—	† 3
—	† [illegible]		
—	† 2 1/2	0,070	† 4
—	† 2		
—	† 2		

On voit donc que, en 1898, la dose minima mortelle (T) est de 0,04 c. c., c'est-à-dire deux fois plus grande qu'en 1896. — En deux ans, le poison est devenu moitié moins toxique.

En examinant les propriétés du poison en mélange avec l'antitoxine, c'est-à-dire en déterminant les valeurs (I) + L_0 et (I) + $L_{\dagger}$, on a obtenu les résultats suivants : (Tableau III.)

Il résulte des expériences résumées dans le tableau III que la valeur de L_0 se trouve entre 2,6 c. c. et 2,7 c. c. et que la valeur de $L_{\dagger}$ est d'à peu près 3,2 c. c.

Les constantes du poison B. peuvent être exprimées comme suit :

$$(T) = 0{,}04 \text{ c. c.}$$
$$L_{\dagger} = 3{,}2 \text{ c. c. ou } 80\ (T)$$
$$L_0 = 2{,}6 \text{ c. c. ou } 65\ (T)$$
$$\overline{\qquad\qquad\qquad\qquad}$$
$$D = 0{,}6 \text{ c. c. ou } 15\ (T)$$

La quantité de toxone contenue dans L_0, calculée par la formule $Z = \frac{200\beta}{\alpha + \beta}$, est de 35 équ.

Les résultats trouvés par l'expérience indiquent que le nombre de toxines-équ. peut être évalué à 66,67. — Ce nombre serait tout à fait exact si la valeur de L_0 qui, ainsi que nous

TABLEAU III

(I) + x c.c. de POISON x	RÉSULTAT	PARALYSIE — Temps d'incubation. Jours. (3)	PARALYSIE — Marche de la maladie.	L_0 contiendrait en équivalents d'antitoxine saturés. (1)	Toxones-équ. libres. (2)
2,3	0	tué.			
2,4	0	tué.			
2,4	0	tué.			
2,5	0	tué.			
2,6	0	tué.		200	
2,6	0	tué.			
2,6	0	tué.			
2,6	⊙	tué.			
2,7	0	tué.		198	
2,7	*	tué.			
2,7	*	tué.			
2,7	*	tué.			
2,8	⊙	tué.		186	15
2,8	*				
2,8	*	tué.			
2,9	*			179	23
2,9	*	27	mort.		
2,9	† 2				
3,0	*			173	31
3,0	*	25	mort.		
3,0	*	20	mort.		
3,0	† 2				
3,1	*	† de cachexie		168	38
3,1	*	19'	mort.		
3,1	† 6				
3,1	† 5 1/2				
3,1	† 3				
3,2	† 6			163	
3,2	† 4 1/2				
3,2	† 3				
3,2	† 3				
3,2	† 2				
3,3	† 4				
3,3	† 3				
3,3	† 3				
3,3	† 3				
3,4	† 3				

1, 2, 3. Voir les notes à la page suivante.

l'avons vu, se trouve entre 2,6 c. c. et 2,7 c. c. était exactement de 2,67, en effet $\frac{2.67}{0.04} = 66,67$.

On peut également admettre que le nombre de toxones-équ. est de 33,33 au lieu d'être de 35.

Le nombre trouvé pour les toxones-équ. peut être vérifié par l'expérience. En saturant L_0 partiellement avec des fractions de (I), on obtient les résultats suivants :

TABLEAU IV

2,6 c. c. + $\frac{x}{200}$ (I)	RESULTAT	PARALYSIE	
		Temps d'incubation. Jours.	Marche de la maladie.
x			
170	.	27	Point de nécrose ou alopécie. Mort.
160	† 3		

Ces expériences nous montrent qu'en ajoutant, à 2,6 c. c. de toxine, 170 équivalents antitoxiques $\left(\frac{170}{200}\right)$, nous n'aurons pas encore une dose mortelle, tandis qu'en ajoutant 160 équivalents

1. Dans cette colonne, on a indiqué les quantités d'antitoxine qui, mélangées à L_0, donneraient les mêmes résultats que 200 unités ou équivalents d'antitoxine mélangés avec les quantités de toxine indiquées dans la 1re colonne. On peut se représenter, en effet, qu'en ajoutant a une quantité déterminée de poison, des quantités progressivement décroisssantes d'antitoxine, on obtiendrait les mêmes résultats qu'en procédant inversement, c'est-à-dire en ajoutant des doses de plus en plus fortes de poison à une quantité déterminée et toujours la même d'antitoxine

En admettant que 200 équivalents de poison + 200 équivalents d'antitoxine donnent un mélange neutre, on peut dire que 220 équivalents de poison + 200 équivalents d'antitoxine donneront le même résultat que 200 équivalents de poison + 182 équivalents d'antitoxine.

Dans un des mélanges indiqués dans le tableau, par exemple dans celui de 2. 9 c. c. de poison + (I), on peut facilement évaluer ces nombres par le rapport suivant :

$$\frac{2.9}{200} = \frac{2.6}{x} \text{ d'où } X = 179 \text{ équ. antitoxiques.}$$

2. Dans cette colonne on indique le nombre de toxones-équ. libres que, pour l'exemple cité plus haut, on peut calculer par le rapport : $\frac{2.6}{21} = \frac{2.9}{x} = 23$

3. La plupart des animaux qui ont survécu ont été sacrifiés pour examiner les réactions au point d'inoculation.

antitoxiques, nous aurons dans le mélange au moins une dose mortelle de poison, c'est-à-dire au moins 1 toxine-équ. libre. Le nombre de toxones-équ. libres sera donc plus élevé que 30 et moins élevé que 40.

Poison A.

Au commencement de l'année 1896, (T) variait de 0,04 à 0,044 c. c. et, 0,1 (I) neutralisait 0,26 c. c. de poison.

Voici les évaluations faites dans le courant de l'année dernière. (tab. V).

TABLEAU V

DATE	0,1 (T) + x c.c. de POISON x	RÉSULTAT	PARALYSIE — Temps d'incubation. Jours.	PARALYSIE — Marche de la maladie.	Toxone-équ. libres.
12/10 97	0,26	0			4,1
	0,26	*			4,4
	0,28	*			
	0,28	*			
	0,30	*			
27/12 97	0,26	0			4,1
	0,26	0			
	0,28	*	27	guéri.	4,4
	0,28	*	24	—	
6/6 98	0,26	0	† de cachexie		4,1
	0,28	*	† —		4,4
12/9 98	0,26	0			4,1
	0,28	*	14	mort.	4,4
	0,28	*	14	mort.	

En même temps, les expériences faites du 9/10 97 au 24/1 98 ont montré une diminution de toxicité de moitié. De 0,04 c. c. à 0,044 c. c. (T) est passé à 0,08 ou 0,09 c. c., moyenne 0,084 c. c., ainsi que cela ressort des indications résumées dans le tableau suivant : (tabl. VI).

Les expériences exécutées entre le 9/10 97 et le 24/1 98 (tableau VIII) ont montré que la quantité de poison neutralisée par (I) était de 2,0 à 2,1 c. c. ; donc $L_0 = 2{,}0$ à $2{,}1$ c. c.

L_+ a pu être évalué à 2,6 c. c. environ.

TABLEAU VI

DOSE en C. C.	RÉSULTAT	PARALYSIE Temps d'incubation. Jours.	PARALYSIE Marche de la maladie.	DOSE en C. C.	RÉSULTAT	PARALYSIE Temps d'incubation. Jours.	PARALYSIE Marche de la maladie.
0,030	*			0,080	† 5 1/2		
				80	† 5		
0,040	*			80	† 5		
40	*			80	† 4 1/2		
40	*			80	† 4		
				80	† 3 1/2		
0,050	*						
50	*	23	guéri.	0,084	† 7		
50	*	19	guéri.	84	† 6		
50	† 4 1/2			84	† 4 1/2		
50	† 4			84	† 4		
				84	† 4		
0,060	*			84	† 3		
60	† 8						
60	† 7			0,090	† 4		
60	† 5			90	† 3		
60	† 4			90	† 3		
				90	† 2 1/2		
0,070	*						
70	† 6			0,100	† 4		
70	† 4			0,100	† 3		

Les expériences ultérieures résumées dans le tableau VII ont montré que la toxicité du poison n'a pas changé.

TABLEAU VII

DATE	DOSE EN C. C.	RÉSULTAT
18/4/98	0.084	† 6
11/5/98	0.084	† 6
	84	† 6
	84	† 6
	84	† 4
	84	† 4
	84	† 3

Comme le poison B, le poison A est devenu deux fois moins toxique, pendant que son pouvoir de fixer l'antitoxine est toujours resté le même.

TABLEAU VIII

(I) + x c. c. de POISON x	RÉSULTAT	PARALYSIE — Temps d'incubation. Jours.	PARALYSIE — Marche de la maladie.	L_0 contiendrait en équivalents saturés d'antitoxine.	Toxone-équ. libres.
2.0	0	27	Guéri. Point de nécrose ou alopécie.		
2,0	0				
2,0	0				
2.0	0				
2,1	0				
2,1	Infiltration minime.	19	Guéri. Point de nécrose ou alopécie.	200	
2,1	—	22	—		
2,1	—	33	—		
2,1	—	33	—		
2,1	⊙				
2,1	⊙				
2,1	⊙	Tués.			
2,1	⊙				
2,1	⊙				
2,1	⊙				
2,2	*	13	Mort. Point de nécrose ou alopécie.	191	10
2.2	*	15	—		
2,2	*	17	—		
2,2	*	20	—		
2,2	*	20	—		
2,2	*	22	—		
2,3	*	17	Mort. Point de nécrose ou alopécie.	183	19
2,3	*	18	—		
2,4	*	25	Mort. Nécrose, alopécie.	175	29
2,4	† 6				
2,5	*	19	Mort. Nécrose, alopécie.	168	38
2,5	† 12				
2,5	† 8				
2,5	† 6				
2,5	† 3 1/2				
2,5	† 3				
2,6	† 4			161,5	41
2,6	† 4				
2,6	† 4				
2,6	† 3 1/2				
2,6	† 3 1/2				
2,6	† 3				
3,0	† 3				

Les expériences exécutées quelques mois plus tard, le 11/5 98 ont donné les mêmes nombres. (tabl. IX).

TABLEAU IX

(I) + x c. c. de POISON x	RÉSULTAT	PARALYSIE		Toxone-équ. libres.
		Temps d'incubation. Jours.	Marche de la maladie.	
2.1	0	20′	Mort.	
2.1	·	25′	—	
2.1	·	30′	—	
2.2	0	tue.		
2.2	0	23′	Mort.	10
2.2	·			
2.3	·	21′	Mort.	38
2.5	† 5			
2.5	† 5			
2.6	·			41
2.6	† 4			
2.6	† 4			

Ainsi, au commencement de l'année 1896, (T) était de 0,04 c. c.

0,1 (**I**) fixait 0.26 c. c.

Au commencement de l'année 1898,

(T) était de 0,084 c. c.

0,1 (**I**) fixait 0.26 c. c.

Les constantes du poison A au commencement de l'année 1898 peuvent être exprimées comme suit :

$$
\begin{aligned}
T &= 0.084 \text{ c. c.} \\
L_+ &= 2.6 \text{ c. c. ou } 31 \text{ (T)} \\
L_0 &= 2.1 \text{ c. c. ou } 25 \text{ (T)} \\
\hline
D &= 0.5 \text{ c. c. ou } 6 \text{ (T)}
\end{aligned}
$$

$$Z = \frac{200.5}{25 + 5} = 33_{133}$$

Très probablement, ces nombres sont un peu trop élevés. L_0 doit être un peu moins que 2.1 c. c., car l'injection du mélange (I) + 2.1 c. c. donnait encore au point d'inoculation une hypérémie impossible à constater au toucher, mais reconnaissable à l'autopsie. Presque tous les animaux qui ont survécu à l'injection de ce mélange ont présenté des paralysies tardives,

ce qui indique l'existence dans le mélange de toxones libres [1].

La valeur $(I) + L_0$ peut être exprimée comme suit :

$$(I) + L_0 = \begin{cases} 141{,}67 \text{ toxoïde-antitoxine.} \\ + 25 \text{ toxine-antitoxine.} \\ + 33{,}33 \text{ toxone-antitoxine.} \end{cases}$$

Pour dégager 33,33 toxone-équ., il faut ajouter à L_0 1/5 de L_0, et pour avoir dans le mélange encore un toxine équ. libre, il faut y ajouter encore $\frac{1}{16{,}67}$ de L_0 [2].

1. Il serait peut-être plus exact d'exprimer les constantes du poison A par les nombres suivants :

$$\begin{array}{l} (T) = 0{,}082 \text{ c. c.} \\ L_{+} = 2{,}55 \text{ c. c. ou } 31\ (T). \\ L_0 = 2{,}05 \text{ — — } 25\ (T). \\ \hline D = 0{,}5 \text{ c. c. ou } 6\ (T). \\ Z = 33{,}33. \end{array}$$

Je ne me suis aperçu que les nombres indiqués pour les constantes sont un peu trop élevés, qu'après avoir comparé les résultats des expériences des différentes périodes. Comme ces différences sont peu importantes, j'ai laissé ces nombres sans correction dans le texte, et j'appelle l'attention sur cette inexactitude chaque fois que cela est nécessaire.

2. Ce nombre ne pouvait être précisé qu'après avoir reconnu la répartition de toxine et de toxoïde dans la zone des tritoxoïdes (voir page 815).

Quand on y ajoute $\frac{33{,}33}{166{,}67}$ $\left(\text{c'est-à-dire } \frac{1}{5}\right)$ de L_0, toutes les 33,33 toxon. équ. seront dégagées, et la limite supérieure de la zone des tritotoxoïdes se déplace de l'abscisse 166,67 jusqu'à 200. Comme la zone des tritotoxoïdes contient une partie de toxine pour 9 parties de toxoïde, il faut ajouter encore 10 équivalents de toxoïde-toxine libres pour obtenir un équivalent de toxine libre (avec 9 équ. de toxoïde libre), c'est-à-dire que la limite de la zone des tritotoxoïdes doit de nouveau être déplacée, cette fois de l'abscisse 200 jusqu'à 210. Comme il y avait en L_0 166,67 équ. de toxoïdes et de toxines, les 10 équivalents formaient $\frac{1}{16{,}67}$ de L_0.

Pour transformer le mélange $(I) + L_0$ en $(I) + L_{+}$, on doit donc ajouter au premier mélange d'abord $\frac{1}{5}$ de L_0 et puis $\frac{1}{16{,}67}$ de L_0.

Il faut remarquer que la formule indiquée par M. Ehrlich dans son premier mémoire, page 26, à savoir :

$$(I) + L_{+} = \begin{cases} x \text{ toxoïde-antitoxine.} \\ + (y + z) \text{ toxine-antitoxine.} \\ + 1 \text{ toxine libre.} \\ + z \text{ épitoxoïde (toxone) libre.} \end{cases}$$

doit, à la rigueur, être corrigée de la façon suivante :

Pour dégager du mélange $(I) + L_0 = x$ toxoïde-ant. $+ y$ toxine-ant. $+ z$ toxone-ant., les Z toxone équ., il faut ajouter à L_0, z équ. à affinité plus grande (toxines et toxoïdes). Or, comme il est impossible d'employer des toxines et toxoïdes pures, mais toujours les mêmes mélanges de toxoïde-toxine-toxone, les z toxoïde-toxine-équ. sont donc accompagnés d'un certain nombre de toxone équ. (z^1), et le

On aura donc dans (I) + L$_{\dagger}$ les différentes parties constituantes de la toxine, saturées et libres, dans les proportions suivantes :

$$(I) + L_{\dagger} = \begin{cases} 170 \text{ toxoïde-antit.} + 30 \text{ toxine-antit.} \\ + 9 \text{ toxoïdes libre.} \\ + 1 \text{ toxine libre.} \\ + 42 \text{ toxones libres.} \end{cases}$$

Comme pour le poison *B*, il a été fait pour le poison *A* une série d'expériences sur l'action de L_0 mélangé avec des fractions de (I) de plus en plus petites. Les résultats des expériences résumées dans le tableau VIII nous montrent que, dans le mélange de 2,5 c. c. de poison + 1 (I) ou 200 équ. d'antitoxine qui, réduit au même degré de saturation de L_0, représenterait L_0 $+ \frac{168}{200}$ (I), la limite de toxones qui devrait être à $\frac{166,67}{200}$ n'est pas encore atteinte, tandis qu'elle est dépassée dans le mélange de 2,6 c. c. de poison (L$_{\dagger}$) + 1 (I) ou $L_0 + \frac{161,5}{200}$ (I) [1].

On retrouve ici le même fait que nous avons aussi signalé pour le poison *B*, à savoir que la limite entre la zone des toxones et celle des toxines n'apparaît pas bien nette. On voit en effet que des mélanges, qui ne devraient contenir que des toxines libres, ont donné la mort à un certain nombre d'animaux injectés.

On pourrait en conclure qu'il n'y a pas de limite bien nette entre la zone des toxones et celle des toxines, mais qu'il y a là une zone de transition graduelle.

Toutefois, ces petites différences peuvent trouver aussi une explication suffisamment justifiée dans la saturation plus ou moins rapide et complète de la toxine par l'antitoxine en solution plus ou moins concentrée et sous l'influence d'une température variable, facteurs qui, ainsi que cela a été établi par M. Ehrlich, ne sont pas négligeables.

Les expériences résumées dans le tableau X ont été faites

dernier toxine-équ. libre sera accompagné de x^1 toxoïde-équ. libres et de z^2 toxone équ. libres.

La formule corrigée serait donc : (I) + L$_{\dagger}$ = $(x + y + z)$ (toxoïde-toxine) antitoxine $+ x^1$ toxoïdes libres + 1 toxine libre + $(z + z^1 + z^2)$ toxones libres.

1. En admettant la correction signalée plus haut ($L_0 = 2,05$ c. c.), on aurait pour 2,5 c. c., le rapport : $\frac{2,5}{200} = \frac{2,05}{164}$, donc 164 au lieu de 168.

TABLEAU X

2.1 c. c. DE POISON $+ \frac{x}{200}$ (1) x	DIVISÉ PAR	RÉSULTAT	PARALYSIE		Toxone-équilibres.
			Temps d'incubation. Jours.	Marche de la maladie.	
180		*			20
170		*	14′	Point d'alopécie. Mort.	30
—		*	† de cachexie.		
—		*	† —		
—		† 4			
168		† 4			32
166		*			33.33
—		† 8			
—		† 3			
164		*			33.33
162		*	14′	Mort.	33.33
—		† 5			
160		*			33.33
—		† 8			
—		† 4			
158	2	*	29′	Alopécie. Mort.	16.67
154	2	*	19	Mort.	16.67
150	2	† 3			
146	2	† 5			
142	2	† 3			
138	3	† 3			
—	4	*			8.33
134	4	† 8			
126	5	*	† de cachexie.		
—	5	*	† —		
100	10	*	† —		
—	12,5	*	† —		
—	12,5	† 12			
—	15	*			2.22
—	15,5	† 5			
—	15.5	† 4			
75	15	*	† —		
50	20	*	17′	Mort.	1.67
—	20	† 5			
—	23	*	25′	Mort.	1.45
—	25	*	28′	Guéri.	1.33
—	25	*	† de cachexie.		
40	25	*	† —		
30	25	0	† —		
—	25	*	† —		
—	25	† 9			
25	25	0			1.33
—	25	† 9			
	25	† 1			
10	30	† 6			

du 13/4 au 9/6 1898. Les nombres indiqués dans la 2e colonne de ce tableau indiquent les fractions des mélanges indiqués par les nombres correspondants de la 1re colonne : ainsi, par exemple, le nombre 30 (le dernier de la 2e colonne) indique que le mélange

de 2. 1. c. c. de poison + $\frac{10}{200}$ (T) a été divisé en 30 doses égales, et que chaque animal n'a reçu qu'une de ces doses.

Cette série d'expériences nous montre bien la zone des toxones, mais ne nous donne pas une image bien claire de la distribution des équivalents à affinité plus grande, c'est-à-dire des toxines et des toxoïdes. Les expériences n'ont pas été assez nombreuses.

La zone comprise entre 167 jusqu'à 130 à peu près (ligne pleine) indique les résultats des expériences consignées dans le tableau X, la zone comprise entre 130 et 40 indique la configuration de la toxine telle qu'elle pourrait être représentée d'après les expériences qui suivent.

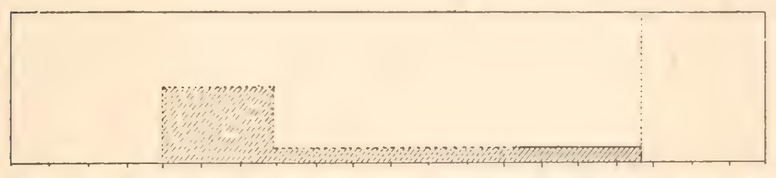


Fig. 5.

La partie ombrée du diagramme représente la distribution des toxines équ.

La partie laissée en blanc, celle des toxones et des toxoïdes. De 200 à 166,67, il y a des toxone-équ. seuls.

Entre 166 et 136, il y aurait 1 toxine équ. pour chaque groupe de 10 équ. A 150, il y a 2 toxines équ. libres, à 1.38 il y en a 3 : mais plus loin les résultats des expériences sont trop peu précis pour permettre de tracer une courbe bien nette. D'après la terminologie de M. Ehrlich, les toxoïdes que l'on trouve dans ce poison seraient des *tritotoxoïdes*.

Pendant les neuf mois qu'ont duré les expériences résumées plus haut, le poison A ne s'est pas modifié, mais les nouveaux essais faits en août 1898 ont fait constater un affaiblissement de toxicité très sensible.

Ainsi, au lieu d'être 0,084 comme auparavant, (T) n'est plus que de 0,120 à 0,130. En admettant comme dose minima mortelle 0,126 c. c., l'affaiblissement peut être évalué à 1/3 ($3/2 \times 0,084$).

TABLEAU XI

DOSE EN C. C.	RÉSULTAT	DOSE EN C. C.	RÉSULTAT
0.084	*	0.110	† 16
84	*	—	† 9
84	*	—	† 8
84	*	—	† 6
84	*	0.126	† 5
84	† 8	—	† 4
84	† 3 1/2	—	† 3
84	† 3	—	† 3
0.090	† 7	0.140	† 3
90	† 7	—	† 3
0.100	† 6		
100	† 6		
100	† 4		
100	† 3		

Dans 2. 1 c. c. il n'y aurait plus maintenant que 17 (16, 67) toxine équ. au lieu de 25.

Les constantes furent déterminées par la série d'expériences résumées dans le tableau XII. — 27/8 — 13/9 1898.

TABLEAU XII

$L_0 + x$ c.c. de POISON x	RÉSULTAT	PARALYSIE		L_0 contiendrait en équivalents saturés d'antitoxine.	Toxone-éq libres.
		Temps d'incubation. Jours.	Marche de la maladie.		
2.1	0				
—	0	14′	mort.		
—	0	24′	mort.		
—	0	† de cachexie.			
—	0	† de cachexie.			
2.2	0	17′	mort.	191	10
—	⊙	tué.			
—	*	tué.			
—		24′	mort.		
—					
2.3	⊙	tué.		183	
	*	tué.			
2.5		† de cachexie.		168	38
		14′	mort.		
2.6		† de cachexie.		161.5	41
—		20′	mort.		
2.8	† 4 1/2			150	44
3.0	† 8			140	
—	† [illegible]				
3.2	† 4			128	
—	† [illegible]				
3.4	† 3				

On voit que L_0 est resté constant, tandis que L† a augmenté très sensiblement. La quantité de toxine qu'il faut ajouter maintenant à 1 (I) pour obtenir un mélange contenant une dose mortelle, n'est plus de 2,6 c. c. mais plus de 3 c. c.

La saturation partielle de L_0 avec des doses fractionnées et décroissantes de (I) a donné les résultats suivants :

TABLEAU XIII

2,1 c. c. + $\frac{x}{200}$ (I) x	DIVISÉ PAR	RÉSULTAT	PARALYSIE Temps d'incubation. Jours.	PARALYSIE Marche de la maladie.	Toxone-équ. libres.
166		*	23′	mort.	33,33
156		*	† de cachexie.		
—	2	*	18′	mort.	16,67
146		† 7			
—	2	*	18′	mort.	16,67
—	3	*	27′	mort.	11,11
140		† 4 1/2			
136	2	*	† de cachexie.		
—	3	*	† de cachexie.		
—	4	*	18′	mort.	8,33
130	2	† 4			
126	3	† 13			
—	4	*	27′	mort.	8,33
—	5	*	23′	mort.	6,67
120	3	† 6			
—	4	† 13			
116	4	† 4 1/2			
—	5	*	27′	mort.	6,67
—	6	*	23′	mort.	5,55
106	6	*	14′	mort.	5,55
—	7	*	26′	mort.	4,77
100	4	† 3			
—	5	† 1			
—	—	† 4			
—	—	† 4 1/2			
—	6	† 8			
—	—	*	† de cachexie.		5,55
—	—	*	14′	mort.	—
—	—	*	14′	mort.	—
100	7	*			4,77
—	9	*	23′	mort.	3,7
—	—	*	23′	mort.	—
—	12	*	23′	mort.	2,77
—	—	*	26′	mort.	—
—	15	*	23′	mort.	2,22
—	—	*	26′	mort.	—
90	5	† 3 1/2			
—	6	† 5			
—	7	† 3 1/2			
80	6	† 3 1/2			
—	7	† 6			
—	8	† 16			

TABLEAU XIII (*Suite.*)

2,1 c. c. + $\frac{x}{200}$ (I) x	DIVISÉ PAR	RÉSULTAT	PARALYSIE Temps d'incubation. Jours.	PARALYSIE Marche de la maladie.	Toxone-équ. libres.
70	6	† 3			
—	7	† 3 1/2			
—	—	† 6			
—	8	† 3			
60	8	† 3			
—	9	† 3 1/2			
—	10	† 12			
50	10	† 4			
—	—	† 4			
—	—	† 4 1/2			
—	12	† 4			
—	—	† 7			
50	12	† 7			
—	14	† 7 1/2			
—	15	*	20′	mort.	2,22
—	—	† 3 1/2			
—	20	*	20′	mort.	1,67
—	—	† 6			
40	15	† 6 1/2			
—	20	† 12			
	—	† 7			
30	10	† 3			
—	—	† 3			
—	12	† 7			
—	—	† 3			
	14	† 4			
	—	† 7			
	20	† 6 1/2			
—	25	*	23′	mort.	1,33
—	—	*	26′	mort.	—
25	12	† 6			
—	15	† 16			
—	—	† 7			
	20	*	23′	mort.	1,67
	—	† 16			
	25	*	23′	mort.	1,33
	—		27′		—
20	25	*	26′	mort.	1,33
—	—	*	26′	mort.	—
10	25	*	† de cachexie.		1,33
—	—	*			

On voit sur le diagramme (fig. 6) que ce n'est qu'à 140 qu'il y a un équ. de toxine libre, que par conséquent la toxine a perdu 2 équ. dans la partie du diagramme qui touche à la zone des toxones. A 130 il y a 2 toxines-équ. libres et ainsi de suite. Conformément à ces faits, la valeur de L+ a augmenté et, bien que les expériences indiquées dans le tableau XIII ne nous per-

mettent pas de fixer la valeur de $L_\dagger$ d'une façon absolument exacte, il n'y a pas de doute que $L_\dagger$ n'est plus de 2.6 c. c. mais se trouve entre 3 c. c. et 3.2 c. c.

En admettant que $L_\dagger$ = 3.1 c. c. les constantes pourraient être exprimées comme suit :

(T) = 0.126 c. c.
$L_\dagger$ = 3.1 c. c. ou 24.6 (T)
L_0 = 2.1 c. c. ou 16.6 (T)

D = 1.0 c. c. ou 8 (T)
Z = c. 59

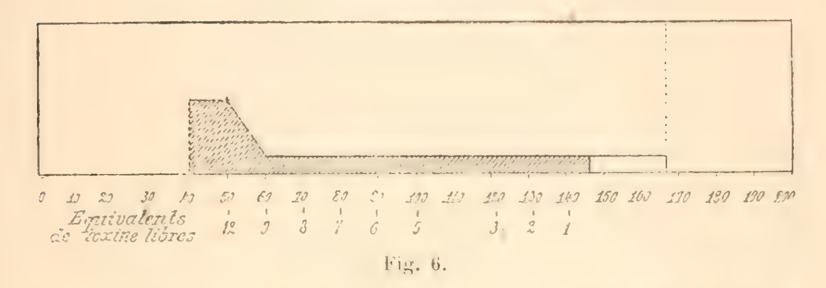


Fig. 6.

On constate donc une augmentation apparente des toxones de 33 équ. à 54-59 équ., ce qui serait contraire à l'opinion de M. Ehrlich, qui admet que la quantité des toxones ainsi que celle des toxines peut diminuer dans un bouillon filtré, mais ne peut jamais augmenter. C'est précisément ce fait qui est la base de son affirmation, que les toxones se forment en même temps que les toxines.

En constatant l'extension apparente de la zone des toxones, on n'est pourtant pas obligé de conclure à une augmentation des équivalents de toxone. Il est bien plus probable que la disparition de 2 équivalents de toxine correspond à une transformation de cette toxine en toxoïdes.

La zone comprise entre 140 et 60 contient 1 toxine équ. pour chaque $\frac{10}{200}$ (T) enlevé, la composition du poison est donc dans cette zone de 1 toxine pour 9 toxoïde équ.

A 60 il y a, en tout, 9 toxines équ. libres; plus bas la constitution de la toxine n'apparaît pas bien nettement : les expériences n'ont pas été assez nombreuses. On constate, toutefois, avec certitude, qu'à 50 il y a 12 toxines équ. libres et qu'au-dessous de

40-30 il ne se dégage plus de toxine. — De 40 à 0 il y aurait donc une zone de prototoxoïdes.

L'affaiblissement du poison continuait toujours; les expériences faites du 16/9 au 21/10 98 ont donné les résultats suivants (Tableaux XIV, XV et XVI) :

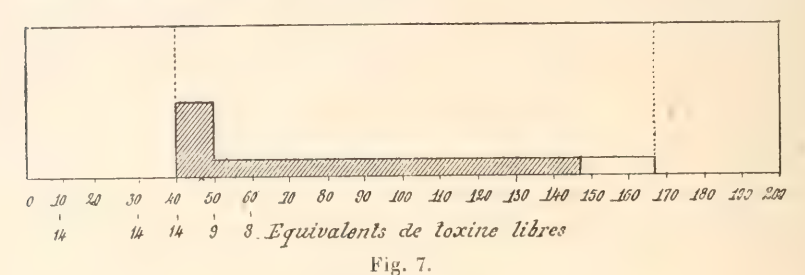


Fig. 7.

TABLEAU XIV

DOSE EN C. C.	RÉSULTAT	DOSE EN C. C.	RÉSULTAT
0,126	*	0,140	† 6
—	† 20	—	† 3
—	† 6	0,150	† 4 1/2
—	† 6	—	† 3

TABLEAU XV

(I) + x c. c. de POISON x	RÉSULTAT	PARALYSIE Marche de la maladie.	L_0 contiendrait en équivalents saturés d'antitoxine.
2,6	*	† de cachexie	161,5
2,7	† 13		155
—	† 7		
—	† 4		
2,8	† 5		150
—	† 6		
2,9	*	† de cachexie	144
—	† 5		
3,0	† 10		140
—	† 8		
3.2	† 2 1/2		131
—	† 2 1/2		

TABLEAU XVI

2,1 c. c. $+ \frac{x}{200}$ (1) x	DIVISÉ PAR	RÉSULTAT	PARALYSIE		Toxone-équ. libres.
			Temps d'incubation. Jours.	Marche de la maladie.	
130	2	† 4 1/2			
—	—	† 4 1/2			
60	8	† 3			
—	—	† 3			
—	9	† 17			
—	—	† 9			
—	—	† 7			
—	10	*	† de cachexie.		
—	—	*	22′	Mort.	3
50	9	† 6			
—	—	† 3			
—	10	† 6 1/2			
—	—	† 6 1/2			
—	12	*	† de cachexie.		
—	—	† 3			
—	14	*	† de cachexie.		
—	—	† 6			
—	16	*	† de cachexie.		
—	—	*	17′	Mort.	2
—	20	*	† de cachexie.		
—	—	*	† de cachexie.		
40	14	† 7			
—	—	† 3 1/2			
—	16	*	† de cachexie.		
—	—	*			2
30	14	† 4			
—	—	† 3			
—	16	*	† de cachexie.		
—	—				2
20	16	† 6			
—	—	† 7			
10	14	† 6			
—	—	† 2 1/2			
—	16	† 7			
—	—				2

La dose minima mortelle est maintenant de 0,15 c. c. — L_0 ne contient que 14 doses mortelles; par contre, on constate que $L_{\dagger}$ est resté invariable. Ceci est en harmonie avec le fait que la formation de toxoïde sur l'intervalle 166-146 n'est pas plus avancée. En effet. à 130, il y a toujours 2 toxines-équ. libres.

En suivant l'affaiblissement du poison sur le diagramme, on constate qu'à 60 il y a maintenant 8 toxines équ. au lieu de 9; à 50 il y en a 9 au lieu de 12; à 40 il y en a 14, et comme $L_0 = 14$, il est certain qu'en dessous de 40 il n'y aura plus que des toxoïdes.

En octobre 1898, le poison A semble donc être constitué de la façon suivante : entre 0 et 40 une zone de prototoxoïdes ; de de 40 à 50 des hémitoxines et des hémitoxoïdes par parties égales, entre 50 et 146 une partie de toxine pour 9 parties de toxoïdes (tritotoxoïdes d'Ehrlich), entre 146 et 167 des toxoïdes et enfin, de 167 à 200 (ou plus exactement : de $166,^{67}$ à 200), il y a $33,^{33}$ équivalents de toxone.

Ce qui frappe surtout ici, c'est l'affaiblissement du poison, en automne 1898, pendant qu'il s'est montré très stable pendant les neuf mois précédents [1].

D'après M. Ehrlich, l'affaiblissement d'un poison doit toujours s'arrêter à un moment donné, et alors il doit conserver sa toxicité invariable pendant très longtemps. Ceci aura lieu quand toutes les modifications peu résistantes de toxine seront transformées en toxoïdes : alors il ne restera que la deutéro et une petite partie de tritotoxine.

D'après la conception de M. Ehrlich, l'affaiblissement du poison A nous montrerait que la modification β de la deutérotoxine se compose de même de différents éléments, contenant, comme la modication β de la tritotoxine, une partie plus résistante et une autre dont la résistance est moindre. La première se montre pour ce poison régulièrement distribuée sur toute la zone des deutéro et tritotoxines dans le rapport de 1 : 9. Elle n'est pas tout à fait stable, mais peut aussi se transformer en toxoïde. *Cette transformation commence où l'affinité est la plus faible, c'est-à-dire par les équivalents près de la zone des toxones.*

L'augmentation de L_{+} en même temps que l'affaiblissement du poison a été mentionnée auparavant. Si M. Ehrlich n'a pas constaté des faits analogues, c'est probablement parce qu'il n'a pas continué l'examen de ses poisons jusqu'à un affaiblissement aussi prononcé que le poison A.

On pourrait peut-être admettre aussi un petit changement simultané de L_0. Le tableau VIII nous montre que la plupart des animaux injectés avec (I) + 2, 1 c. c. ont présenté un petit œdème observable le plus souvent encore à la fin de l'expérience au 4e jour. Pas une seule fois, on ne pouvait constater d'œdème dans

1. Cet affaiblissement tient peut-être au fait qu'à la fin des essais, le flacon contenant le poison s'est trouvé à moitié vide et que la transformation est devenue dans ces conditions plus rapide. Ce fait m'a été confirmé par M. Ehrlich.

les expériences qui ont été faites plus tard après l'affaiblissement du poison (tableau XII). Cependant les effets secondaires du poison (paralysie, cachexie) sont les mêmes dans les deux cas, de sorte qu'il n'y a pas lieu de croire que (I) fixe en réalité des quantités de poison moindres (élimination de groupes haptophores : il est plus probable que les groupes toxophores (causant des œdèmes) des toxones sont affaiblis de la même manière et par les mêmes causes que ceux des toxines. En somme, le nombre d'équivalents fixateurs du poison s'est conservé invariable malgré le grand affaiblissement de ses qualités *toxiques*.

Poison C.

La culture sortie de l'étuve le 19 10 98 a été filtrée et examinée aussitôt.

La dose minima mortelle pouvait être évaluée d'abord à 0,006 — 0,007 c. c.

Un peu plus tard, la toxicité a baissé un peu, la dose minima mortelle était de 0,009 c. c.

L_0 a pu être évalué à 0,6 c. c. et la valeur de $L_{\dagger}$ 0,82 c. c.

Les constantes du poison C, examiné à l'état frais, peuvent être représentées comme suit :

$$(T) = 0.006 \text{ c. c.}$$
$$L_{\dagger} = 0.82 \text{ c. c. ou } 136.67 \text{ (T)}$$
$$L_0 = 0.6 \text{ c. c. ou } 100 \text{ (T)}$$
$$D = 0.22 \text{ c. c. ou } 36.67 \text{ (T)}$$
$$Z = 52.6$$

La saturation partielle de L_0 par des fractions de l'unité immunisante a confirmé les résultats constatés dans les expériences précédentes et nous a permis de tracer le diagramme fig. 8.

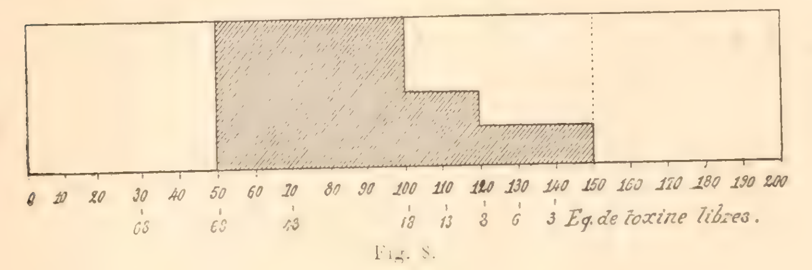


Fig. 8.

Ici encore on ne peut considérer la constitution du poison, représentée par le diagramme, que comme un schéma approximatif.

Ainsi, entre 150 et 120, il y a là maintenant 2 à 3 équ. (1/4) de toxine pour 8 à 7 (3/4) équ. de tritotoxoïdes; entre 120 et 100, il y a 0 hémitoxines pour 0 hémitoxoïdes; entre 100 et 50, il y a encore 50 équ. de toxine pure; enfin, il faut admettre que les 50 équivalents qui se trouvent entre 50 et 0 sont composés exclusivement de prototoxoïdes.

Poison D.

Immédiatement après la sortie de l'étuve, la dose minima mortelle était environ de 0.0030 c. c. — 0.0035 c. c.

Déjà 15 jours après, on pouvait apprécier un affaiblissement sensible; la dose minima mortelle était de 0.004 c. c.

Les expériences faites pour déterminer L_0 donnent une valeur de 0,44 c. c., ce qui, en évaluant la dose minima mortelle à 0.0033 c. c., donnerait : $L_0 = 0.44$ c. c. ou 133,33 doses mortelles.

Une unité immunisante aurait donc fixé dans ce cas 133 doses mortelles.

Il nous a été malheureusement impossible de continuer les recherches sur ce poison, qui s'est trouvé infecté par des bactéries, bien que conservé sous une couche de toluol.

Les recherches qui viennent d'être exposées confirment l'hypothèse admise par M. Ehrlich, à savoir : l'existence dans le poison diphtérique de deux substances différentes, dont l'une, la *substance haptophore*, fixe l'antitoxine, dont l'autre, la *substance toxophore*, produit l'effet toxique sur les animaux sensibles.

Nous avons constaté, en effet, en examinant les rapports entre (T) et L_0, des poisons A et B, que L_0 *restait invariable, pendant que le volume de (T) augmentait d'une façon très appréciable.*

La dose minima mortelle du poison A était successivement de 0.04, 0.08, 0.15, tandis que pour neutraliser 1/10 d'une unité immunisante, il fallait *toujours* 0.26 *c. c. de poison.*

Il est même très probable que le poison A pourrait perdre en totalité sa toxine, sans rien perdre de son pouvoir fixateur de l'antitoxine.

Cette supposition fut confirmée par l'observation suivante :

Aussitôt après avoir été filtrée sur terre poreuse, une partie du poison A avait été diluée dans un volume d'eau distillée, une autre partie a été conservée non diluée et sans antiseptique dans des bouteilles de 100 c. c., remplies et bien closes.

Le poison dilué a servi aux expériences précitées, l'autre non dilué n'a pas été touché pendant 3 ans. Au bout de ce temps, les contenus de 10 de ces flacons de 100 c. c. ont été mélangés et essayés. La détermination des constantes a donné les résultats suivants :

$$
\begin{array}{lcl}
(T) & = & 0.12 \text{ c. c.} \\
L_{+} & = & 1.8 \text{ c. c. ou } 15 \text{ (T)} \\
L_{0} & = & 1.2 \text{ c. c. ou } 10 \text{ (T)} \\
\hline
D & = & 0.6 \text{ c. c. ou } 15 \text{ (T)}
\end{array}
$$

Une unité immunisante ne peut donc neutraliser, dans ce cas, que 10 équivalents de toxine, et il est permis de supposer qu'on pourrait neutraliser l'antitoxine par un poison qui ne contiendra plus du tout de toxine proprement dite.

Il semble donc que *le caractère* dominant *des groupes haptophores est d'être très stables*, pendant que les groupes toxophores subissent rapidement des transformations profondes.

L'expérience suivante fut entreprise pour évaluer le degré de la résistance des groupes toxophores et haptophores. Un flacon de 100 c. c. de poison fut exposé pendant 15 jours à la lumière d'une fenêtre donnant au sud.

Dans ce cas, il y a eu une diminution très sensible de la toxicité et en même temps une augmentation correspondante des valeurs L_0 et L_+ : ainsi, quand on soumet le poison diphtérique à l'action d'agents destructeurs, tels que la lumière, il y a destruction simultanée des groupes toxophores et des groupes haptophores.

Quelques-uns des animaux injectés avec ce poison exposé à la lumière sont morts de cachexie quelques semaines après l'inoculation, sans avoir présenté rien de caractéristique ni dans le cours de la maladie ni à l'autopsie. On peut en conclure que les toxoïdes qui ont résisté à l'action de la lumière ne sont

pas complètement inoffensifs, mais qu'ils produisent d'autres effets que la toxine et la toxone.

Un autre fait encore se dégage de ces recherches, à savoir : *que la transformation du poison se fait d'après des lois déterminées, et que les nombres que l'on trouve en déterminant les constantes dans les différentes phases de transformation d'un poison, sont en proportions simples avec le nombre* 200.

En tenant compte des rapports entre (T) et L_0 constatés pour les différentes études des transformations des poisons A, B et C et D, on voit que l'on a les nombres :

$16.^{67}$ (T) : du poison A ; $66.^{67}$ (T) des poisons B et C ; 100 (T) du poison C ; $133.^{33}$ (T) du poison D.

Etant donné que le poison B n'est affaibli de moitié dans les cours des expériences pendant que la valeur L_0 n'a pas varié, on peut admettre que L_0 du poison B était primitivement de $133.^{33}$ (T).

L'existence de ces $133.^{33}$ (T) dans le L_0 de deux des quatre poisons examinés est en désacord avec les idées d'Ehrlich, qui croyait que L_0 devait toujours contenir primitivement 100 (T).

L'existence de 133.33 équ. de toxine dans ces poisons peut être expliquée comme suit :

D'après M. Ehrlich, la plupart des poisons sont à l'état frais des demi-poisons ($L_0 = 100$ toxine équ. + 100 toxone équ.). Ce savant a observé quelquefois une disparition d'une certaine quantité de toxones (formation de « toxonoïdes ») simultanément avec la transformation d'une partie de la toxine en toxoïde. Un poison transformé de cette manière contiendrait donc relativement plus de toxine-équ. que de toxone-équ. ; or, comme (I) fixe toujours 200 équivalents de poison, ce dernier peut être composé de plus de 100 équ. de toxine.

Des recherches plus nombreuses et plus précises nous obligeront peut-être un jour à admettre un autre nombre pour définir la puissance de neutralisation de l'unité immunisante, mais toutes les expériences faites jusqu'à présent confirment l'hypothèse que ce nombre est de 200.

En établissant cet ensemble de règles précises pour l'appréciation de la valeur de l'unité immunisante et de la constitution du poison diphtérique, M. Ehrlich a trouvé une unité de mesure stable, et a donné à toutes les recherches sur cette question des

cadres assez précis pour en rendre les résultats comparables.

L'antitoxine, conservée avec des précautions nécessaires, peut, en effet, être gardée invariable pendant un temps très long, de sorte que l'unité d'immunisation, une fois établie, fournira pour toujours un terme de comparaison stable et invariable.

Les déterminations des valeurs L_0 et $L_{\dagger}$, et mieux encore les saturations partielles de L_0 par des fractions de plus en plus petites de l'unité d'immunisation, ont confirmé d'une façon indiscutable l'exactitude des faits qui font la base des déductions théoriques de M. Ehrlich.

L'ensemble des recherches résumées plus haut nous ont permis de constater aussi que, si la toxine seule possède la propriété de causer une intoxication aiguë, amenant la mort en 3 à 5 jours, les autres éléments du poison n'étaient pas non plus complètement dépourvus de propriétés pathogènes.

De ces éléments, seuls les éléments à l'affinité la plus faible, les *toxones*, ont pu être isolés et étudiés séparément, et on peut dire *qu'une des propriétés des toxones est de produire des paralysies tardives.*

Les expériences résumées dans les tableaux VII et VIII permettent de constater que ces paralysies peuvent être produites par la *toxone seule*. En effet il est impossible d'admettre l'existence de toxine libre dans, par exemple, (I) + 2.1 c. c. de ce poison, d'une part, parce que ce mélange se rapproche de très près du point de neutralisation : et d'autre part, parce que l'œdème qui se forme après l'inoculation disparaît complètement du 3e au 7e jour, et n'est jamais suivi de nécrose ou d'alopécie, qui ne manquent pas d'une manière générale, après l'injection de toxine.

En consultant sur les tableaux ci-dessus les effets produits par l'injection des mélanges compris entre les doses L_0 et $L_{\dagger}$, et des mélanges partiellement saturés par des fractions de l'unité immunisante, on remarque tout d'abord qu'il n'y a en apparence aucun rapport entre la quantité de toxone injectée et les effets produits. On constate, en effet, des paralysies graves se terminant par la mort après l'injection de mélanges qui ne devraient contenir que 1 ou un petit nombre de toxones-équ. libres, tandis que la paralysie manque parfois après l'injection des mélanges qui devraient contenir 30 ou 40 équivalents de toxone.

Mais on peut affirmer que, d'une manière générale, on observe

des guérisons chez des animaux qui ont reçu des petites quantités de toxone, tandis que la mort est la règle pour les animaux qui en ont reçu des quantités plus considérables. Quelle que soit la quantité de toxone injectée, la paralysie manque très rarement.

Parfois les animaux ne présentent qu'une gêne plus ou moins durable dans les mouvements de l'arrière-train, qui n'est révélée que par un examen attentif des animaux. Les causes extérieures et surtout le froid influent aussi beaucoup sur l'issue de la maladie causée par l'injection des toxones [1].

L'incubation est généralement très longue; suivant la quantité de toxone injectée elle peut durer de 13 à 33 jours.

Dans la tableau qui suit (XVII), nous avons donné une description plus détaillée des symptômes que l'on observe après l'injection des toxones. Toutes ces expériences ont été faites avec le poison *C*.

En ce qui concerne la marche générale des paralysies, je n'ai rien à ajouter à ce qui a été indiqué dans mon travail précédent (*l. c.*, p. 439).

Le fait, que les paralysies sont produites par les toxones, nous explique pourquoi on n'observe *presque jamais* de paralysie chez des animaux qui ont survécu aux expériences de détermination de la toxicité du poison diphtérique, tandis qu'elles sont *très fréquentes* à la suite des expériences de détermination des sérums d'après l'ancienne méthode de M. Ehrlich, où on considérait l'apparition des œdèmes comme une preuve de l'existence de poison libre dans les mélanges de poison et d'antitoxine.

Dans le premier cas, surtout quand on injecte moins d'une dose mortelle d'un poison frais, la quantité de toxone injectée ne peut jamais excéder un équivalent : elle doit même être souvent de beaucoup inférieure à 1 équ., et par conséquent trop faible pour produire des paralysies appréciables. Ce n'est que chez les animaux injectés avec une dose voisine de (T), et qui contiendrait par exemple environ 0.8 équ. de toxone (tableau VI), qu'on peut observer une paralysie, généralement légère.

Si, au contraire, le poison est très affaibli, c'est-à-dire si (T) représente un volume considérable, la dose mortelle (T) peut

1. Zur Biologie des Diphtheriebacillus. *Zeitschr. für Hyg.*, XXVI, p. 188.

TABLEAU XVII

0,6 c.c + $\frac{x}{200}$ (I)	RÉSULTAT	PARALYSIE — Temps d'incubation. Jours.	PARALYSIE — MARCHE DE LA MALADIE	Toxone-équ. libres.
190	Pas d'infiltration.	32	1/1 99. Poids 340 gr. Pas de nécrose ou alopécie. Quelque chancellement dans la partie postérieure sous des mouvements rapides. L'animal se meut d'une manière entièrement libre et vive, mais en des petits coups qui diffèrent des mouvements ordinaires des cobayes. 9/1 99. Poids 350 gr. Rien d'anormal	10
180	Pas d'infiltration.	30	5/1 99. Poids 320 gr. Pas de nécrose ou alopécie. Quelque chancellement de la partie postérieure . . . . 1/1 99. Poids 320 gr. Mêmes observations. Si l'animal est tourné sur le dos il se redresse sans gène, mais la partie postérieure est un peu en retard. 9/1 99. Poids 320 gr. Paralysie légère mais nettement prononcée des membres postérieurs. 11/1 99. Poids 320 gr. Même état. 13/1 99. — 350 gr. Amélioration. 16/1 99. — 360 gr. Guéri.	20
170	Infilt. minime, qui a cessé au 4e jour.		Mort par hasard.	
160	Petite infilt. qui a cessé au 6e jour.	21	21/12 98. Poids 330 gr. Pas de nécrose ou alopécie. Chancellement de la partie postérieure. 28/12 98. Poids 310 gr. Paralysie légère des membres postérieurs. 30/12 98. Poids 280 gr. Les membres antérieurs sont attaqués légèrement, les membres postérieurs médiocrement. 2/1 99. Poids 250 gr. Même état. 4/1 99. — 250 gr. Même état. 6/1 99. — 280 gr. Amélioration. 9/1 99. — 290 gr. Encore quelque chancellement de la partie postérieure. 13/1 99. Poids 330 gr. Seulement des traces de paralysie. 16/1 99. Poids 360 gr. Guéri.	40
150	Petite infilt. qui a cessé au 8e jour.	21	27/12 98. Poids 220 gr. Pas de nécrose ou d'alopécie. Chancellement de la partie postérieure... 29/12 98. Poids 220 gr. Paralysie forte des membres postérieurs, paralysie légère des membres antérieurs. 31/12 98. Poids 200 gr. Paralysie universelle. 1/1 99. Poids 200 gr. Mort.	40
140	† 3 jours apr. l'inj.			

contenir 1 ou plusieurs équivalents de toxone, et peut alors produire des paralysies graves.

On s'explique facilement la fréquence des paralysies, quand, d'après l'ancienne méthode d'Ehrlich, on admettait comme mesure 10 (T) et l'absence de toute réaction ou l'apparition des œdèmes qui indique la mise en liberté des toxones.

Quant à *l'œdème* produit par les toxones, mes observations confirment entièrement celles de M. Ehrlich : il se distingue de celui produit par la toxine par sa courte durée et par l'absence de nécrose et d'alopécie au point d'inoculation.

On peut aisément suivre pas à pas les différents caractères de l'œdème dans les expériences qui ont pour but la détermination de L_+ en partant de L_0. On peut alors juger de l'effet produit tout d'abord par des quantités de plus en plus grandes de toxone seule et des mélanges de toxone et de toxine.

Les toxones de tous les poisons diphtériques ont-elles toujours les mêmes propriétés ? Les expériences suivantes semblent prouver que non. En effet en comparant les quantités du poison *A* et du poison *B* qui sont neutralisées respectivement par 1/10 de (I) et par 1 (I) on trouve :

A — pour neutraliser	1/10 de (I)	il faut	0.26 cc.	de poison
« «	1 (I)	«	2.1 cc.	«
« obtenir	L_+ + 1 (I)	«	2.6 cc.	«
B — pour neutraliser	1/10 de (I)	il faut	0.26 cc.	de poison
« «	1 (I)	«	2.6 cc.	«
« obtenir	L_+ + 1 (I)	«	3.2 cc.	«

Ainsi, pour le poison *B*, 1 (I) neutralise exactement 10 fois plus de poison que 1/10 de (I), tandis que, pour le poison A, la quantité 10 fois plus grande que celle qui neutralise 1/10 de (I) n'est pas L_0, mais L_+.

Ceci tend à prouver que dans le mélange de 1/10 (I) + 0.26 c. c. de poison *A*, il y a nécessairement un peu de poison libre.

Nous avons vu plus haut (page 812) que le mélange (I) + L_+ contient : 170 toxoïde antitoxine + 30 toxine-antitoxine + 9 toxoïde + 1 toxine + 42 toxone. Un dixième de ce mélange contiendra donc, en fait d'éléments libres : 0.9 toxoïde + 0.1 toxine + plus 4. 2 toxone, qui ne peuvent pas donner de réaction par inoculation sous-cutanée. Pour provoquer un œdème appréciable

et constant, il faut injecter 1/10 de (I) + 0.28 c. c. des poisons *A* et *B;* on a alors environ 4,4 équ. de toxone pour le poison *A* et 1.5 équ. de toxone pour le poison *B*, et on constate que puisque, malgré cette différence de dose, les effets produits par les deux poisons sont à peu près les mêmes, il doit y avoir une différence dans l'activité de ces deux toxones. Cette différence apparaîtra d'autant plus considérable quand on tiendra compte de ce fait que dans le mélange de 1/10 de (I) + 0.26 c.c. de poison *A*, il y a 1/10 d'équ. de toxine libre, et que par conséquent, en injectant des doses plus élevées, les effets de la toxine s'ajoutent à ceux produits par la toxone.

Les expériences qui suivent font ressortir les effets des éléments du poison rendus libres dans les mélanges représentant des multiples de 1/10 (I) + 0.26 c.c. du poison *A*.

FRACTIONS de (I)	QUANTITÉ de POISON EN C. C.	RÉSULTAT	PARALYSIE	
			Temps d'incubation. Jours.	RÉSULTAT
1/10	0.26	0		
2/10	0,52	*	26	mort.
3/10	0,78	*	15	mort.
4/10	1.04	† 6		
5/10	1.30			
1	2.60	† 4		

Les expériences faites avec le poison *C* ont montré que les toxones de ce poison ne possèdent la propriété de produire des œdèmes qu'à un très faible degré.

Ces différences, dans les propriétés pathogènes des toxones, avaient probablement causé des irrégularités que l'on rencontrait en déterminant la valeur L_0 par l'ancienne méthode d'Ehrlich. Ces irrégularités sont complètement évitées quand, au lieu de la production de l'œdème, on prend pour critérium d'appréciation la valeur $L_{\dagger}$, c'est-à-dire la mort de l'animal dans un temps déterminé et n'excédant pas 5 jours. L'intoxi-

cation aigüe ne peut, en effet, être produite que par la toxine.

Toutes les expériences faites dans notre laboratoire nous ont prouvé que cette dernière méthode donne des résultats d'une exactitude parfaite[1].

Je ne peux pas terminer ce travail sans exprimer mes vifs remerciements vis-à-vis de M. le professeur C. J. Salomonsen, directeur du laboratoire de Bactériologie médicale de l'Université de Copenhague, qui toujours a suivi mes recherches avec le plus grand intérêt.

1. En appliquant à la lettre la nouvelle instruction de M. Ehrlich, adoptée en Allemagne, on trouve pour l'unité d'immunisation une valeur un peu plus grande que celle qui a servi de point de départ. Les sérums examinés sont, en réalité, un peu plus forts qu'ils ne sont notés, mais la différence est tellement petite qu'elle peut être négligée dans la pratique.

LA PESTE EN MONGOLIE ORIENTALE

Par le Dr ZABOLOTNY

Membre de l'expédition russe pour l'étude de la peste.

En quittant *Pékin* [1], nous nous sommes dirigés vers *Toung-kia-yng-tzeu*, le lieu de notre destination, où la peste a été signalée par le docteur Matignon [2] et les missionnaires catholiques.

Pour y arriver, il a fallu traverser d'abord le pays montagneux de *Khingan*, ce qui nous a demandé quinze jours de voyage. Toung-kia-yng-tzeu est un village situé à 42°3' de latitude nord et 118° de longitude ouest, par rapport au méridien de Paris; son altitude est de 1,265 mètres. Lorsqu'on veut y arriver, sans passer par Pékin, on suit le plateau de Gobi, et alors on a à franchir une série de petites vallées, disposées parallèlement et séparées les unes des autres par de petites chaînes de montagnes pas plus hautes que le plateau lui-même.

Les montagnes sont recouvertes de forêts. Toutes les vallées sont habitées.

Les villages ne sont pas grands, mais très populeux. Les maisons chinoises, appelées « phanses », sont couvertes de paille; elles sont petites, se composent de deux pièces et renferment généralement toute une famille de 10 à 20 personnes.

La population est presque toute chinoise. On rencontre aussi des Mongols, mais ceux-ci parlent chinois et ont déjà des mœurs chinoises.

Presque tous les pestiférés étaient catholiques; car, en se fréquentant entre eux, ils ont ainsi plus de chances de se contaminer que les païens qui évitent les malades.

Les missionnaires qui nous ont donné l'hospitalité étaient Belges ou Hollandais.

Les bons rapports qu'ils entretiennent avec les Chinois nous ont beaucoup facilité l'observation des malades.

1. Nous nous sommes rendus à Pékin par la Sibérie (chemin de fer transsibérien) et le désert de Gobi (caravanes).
2. Dr Matignon, Peste en Mongolie, *Médecine moderne* 1898, p. 113.

D'après ces missionnaires, parmi lesquels je dois nommer tout particulièrement le père Léon Desmet, la peste existe dans cette localité depuis une dizaine d'années ; elle a fait d'abord son apparition au nord de So-len-ko, non loin de Toung-kia-yng-tzeu, puis dans les villages chrétiens.

Depuis, il ne se passe pas d'année sans peste, notamment en août et septembre ; avec la saison froide, la peste disparaît.

Les Chinois connaissent très bien cette maladie qu'ils désignent sous le nom de *regne-tzay, vegne-y* : elle se traduit par un malaise général, avec céphalalgie, fièvre, somnolence et apparition des bubons, connus sous le nom de « gada » ; si le « gada » manque, c'est la forme pneumonique que l'on observe.

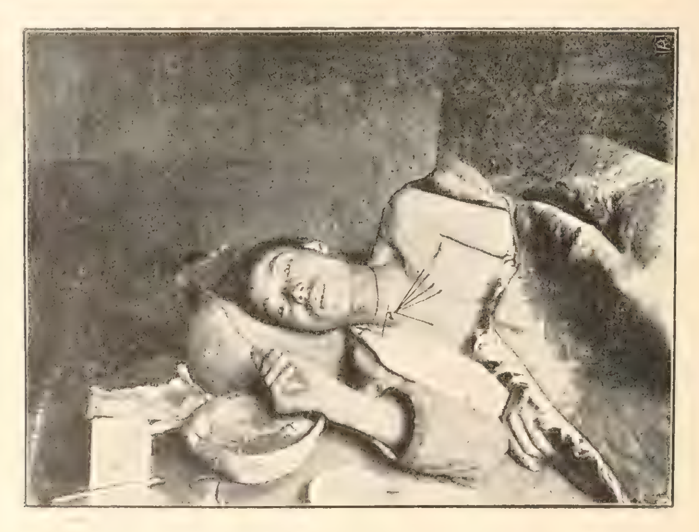


Fig. 1. — Chinois atteint de la peste. Les lignes divergentes indiquent la place du bubon au cou.

Tandis que dans la forme bubonique on enregistre encore des cas de guérison, dans la forme pneumonique l'issue est toujours fatale.

Jamais je n'ai eu l'occasion d'observer, dans cette forme de peste, de guérisons spontanées. Pendant les deux ou trois premiers jours, le malade tousse, rend des crachats sanguinolents, puis il meurt au troisième ou quatrième jour.

Les Chinois se rendent bien compte de l'inefficacité de

leurs remèdes, et ils témoignent une certaine confiance dans ces circonstances aux missionnaires et médecins européens.

Il n'y a, ni dans les villes, ni dans les villages, d'organisation sanitaire tant soit peu appréciable. Le Chinois, fataliste de sa nature, ne craint point la mort. On peut lui annoncer, sans détours, qu'il va mourir demain ou même aujourd'hui, sans que cette nouvelle ait le pouvoir de l'impressionner; il se borne à vous en remercier, réunit sa famille pour lui faire ses adieux et lui faire part de ses dernière volontés. Quand il s'agit d'un père de famille sur le point d'être emporté, la meilleure preuve d'affection filiale se traduit par l'empressement d'acheter un joli cercueil, que l'on présente au regard du moribond.

Les premiers cas de peste que nous avons observés (le 3 sep. 1898) ont eu lieu à *Ma-lien-tao*, village chinois près de *Toung-kia-yng-tzeu*; ils se sont présentés avec tous les signes cliniques propres à la peste : début rapide avec fièvre, somnolence, injection des yeux.

Nos conditions d'études n'étaient pas bien favorables. Nous nous sommes installés avec notre laboratoire à l'église des missionnaires de *Toung-kia-yng-tzeu*. Il était impossible de choisir pour cela le village même où se trouvaient les malades, car les maisons y sont très malpropres, très sombres et, en plus, trop petites pour que l'on puisse placer là les appareils (microscope, étuve, etc.). Nous avons, du reste, estimé plus raisonnable de ne pas faire des expériences devant les Chinois. Mais, ceci avait l'inconvénient de demander tous les jours 4 à 5 heures pour l'aller et le retour.

Notre premier cas, quoique traité, ne compte pour ainsi dire pas, la maladie étant très avancée et se présentant sous forme de pneumonie très grave. Si nous avons injecté au malade du sérum à deux reprises (40 c. c. et 50 c. c.), c'est uniquement en cédant aux instances pressantes du père Desmet, qui était très lié avec lui. Ce malade était un médecin du village, notre collègue par conséquent. Après la première injection, la température tomba de 40° à 37°8, mais elle s'éleva de nouveau le lendemain ; le malade s'est mis à cracher le sang et il est mort dans les 24 heures, avec 40°,6 de temp. ; pouls, 150 ; resp. 60 ; ses crachats sanguinolents présentaient presque une culture pure de bacilles se colorant aux pôles. Il était impossible de

penser à faire l'autopsie ; la seule opération que l'on nous permit fut une ponction pour prélever un peu de liquide des poumons, au niveau des foyers des râles crépitants entendus durant la vie.

Au moyen d'une seringue et de pipettes Pasteur, j'ai recueilli assez de liquide pour en faire des cultures et des préparations microscopiques. Dans les cultures visqueuses ainsi obtenues, le bacille pesteux se trouvait presque à l'état de pureté avec tous ses caractères connus. Les inoculations chez les rats ont donné des résultats positifs.

Sur les quinze autres cas, nous avons observé la pneumonie dans 6 cas, la peste bubonique dans 8 cas, et, dans un cas, la forme septicémique.

Sur le total de 16 pestiférés, nous avons enregistré 12 morts, 4 seulement ont guéri et cela grâce au sérum.

La forme bubonique a été tout à fait caractéristique avec bubons tuméfiés et douloureux, fièvre, somnolence, pouls irrégulier, et une quantité innombrable de bacilles dans le contenu des bubons.

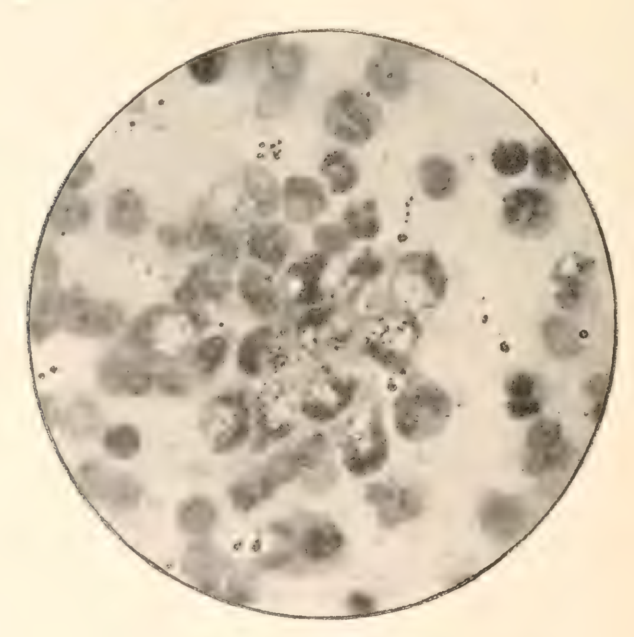


Fig. 2. — Phagocytose dans le pus d'un bubon.

Il est certain que nous nous trouvons là en présence, en Mongolie Orientale, d'un foyer endémique de peste bubonique qui, d'après les témoignages des missionnaires et du docteur Matignon, existe déjà depuis plus de dix ans. L'épidémie, qui fait son apparition en été, emporte tous les ans plusieurs dizaines d'indigènes.

On estime à 400 le nombre de victimes depuis trois ans dans les villages avoisinant *Toung-kia-yng-tzeu*.

Cette année, la peste se déclara dans une autre vallée qui conduit aux grandes villes de *Hata*, *Dao-miao*, etc. Il est à craindre qu'elle ne se propage l'année prochaine plus loin, en s'étendant jusqu'aux bords de la mer. Ces villes sont situées sur la grande route commerciale qui commence à *Dolonnor* pour se terminer en *Mantchourie* (Moukden), en passant par *Tzin-tcheu* et *New-chwang*.

La proximité de plusieurs grandes routes rend ce foyer excessivement dangereux pour la *Chine* aussi bien que pour la *Mongolie*, la *Mandchourie* et, par conséquent, pour la *Russie*.

Le foyer n'est pas encore bien étendu, et on a juste le temps pour prendre des mesures nécessaires pour enrayer l'épidémie.

Quant à l'origine de cette dernière, on ne possède pas encore des données bien précises. Mais voici une hypothèse que nous considérons comme bien probable. Depuis longtemps est connue en Mongolie une maladie des rongeurs, assez grave, désignée sous le nom de *peste de tarabaganes* (*Arctomis Bobac*).

Cette maladie est très contagieuse. Les Bouriates qui se nourrissent des tarabaganes, sans les faire cuire préalablement, prennent une maladie qui, d'après la description des médecins russes, présente des caractères septicémiques avec fièvre très violente, somnolence et tuméfaction des ganglions. Cette maladie fournit une mortalité très élevée. Quand elle apparaît dans une famille, chez un des membres, presque tous les autres finissent par en devenir victimes et y succombent.

Un médecin et son assistant, après une autopsie, tombèrent tous les deux malades, et un d'eux est mort.

S'il faut juger d'après les signes cliniques, on peut presque affirmer qu'il s'agit là d'une épidémie de peste à bubons.

En 1885, il se déclara une forte épidémie parmi les tarabaganes de Mongolie, et en même temps la maladie éclate parmi

les indigènes. On est donc autorisé à déclarer que *toujours la peste humaine est précédée de celle des rongeurs*, quelle que soit l'espèce à laquelle ceux-ci appartiennent.

La peste des tarabaganes, qui n'est pas encore suffisamment étudiée, mérite toute notre attention en raison du rôle important qui lui est peut-être dévolu dans la transmission de la peste en Mongolie, où les rongeurs sont très nombreux. (*Arctomis Bobac, Spermophilus.*)

Le diagnostic bactériologique bien établi, nous avons passé à l'étude clinique de nos malades et des effets du traitement par le sérum.

Ce qui nous a frappé tout d'abord, c'était la proportion considérable des formes pneumoniques. Parfois, dans les crachats de ces malades, on constate la présence de microbes étrangers, mais dans la plupart des cas on y trouvait presque une culture pure de bacilles pesteux. Tant que les crachats sont visqueux, on y trouve plusieurs espèces saprophytes, mais dès qu'ils deviennent sanguinolents, ils contiennent un grand nombre de bacilles pesteux, accompagnés de *streptocoques* et *diplocoques lancéolés.*

Les signes cliniques consistent seulement en une respiration rude, râles crépitants, disséminés au niveau de foyers bien limités.

Dans leur vie intime, les Chinois se comportent de façon que l'épidémie trouve en eux les meilleurs auxiliaires pour sa propagation. Ils couchent sur le même lit, malades et bien portants, ils mangent dans les mêmes assiettes, ne se lavent jamais les mains après avoir donné des soins aux malades. Ceux-ci crachent partout, sur les murs et sur le lit, et toute la famille respire dans l'atmosphère chargée de ces poussières dangereuses. Un de nos malades avait trois chats qui sont morts dans l'espace de trois jours après avoir léché ses crachats.

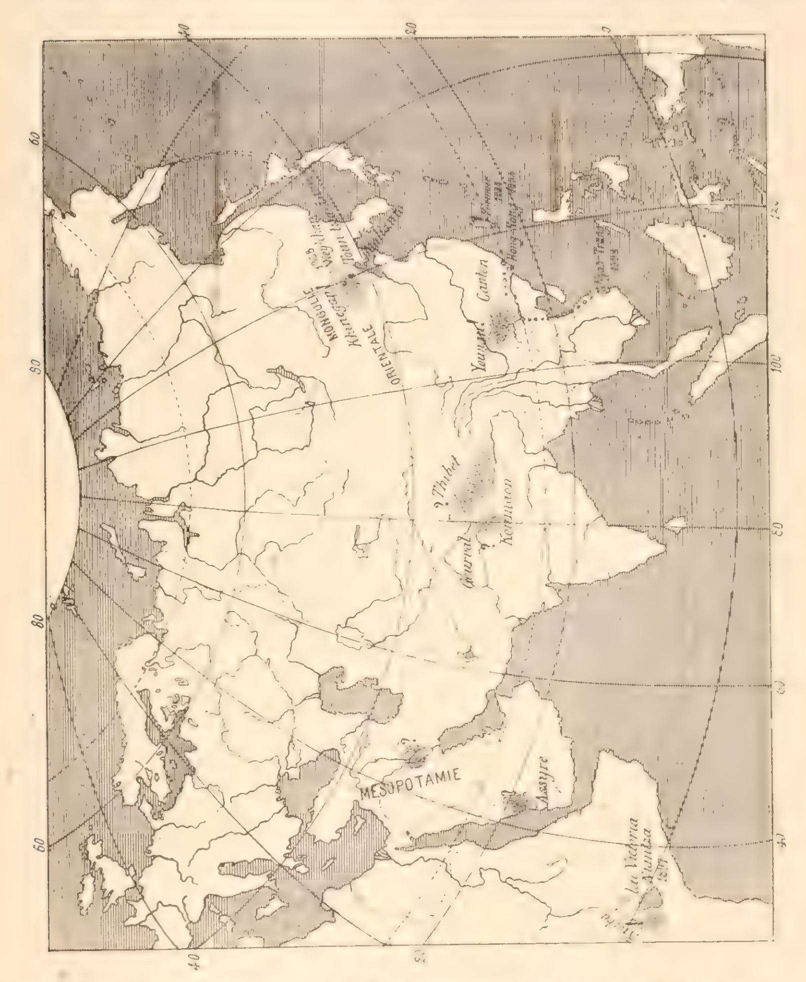
La durée de la pneumonie pesteuse ne dépasse pas ordinairement 4-5 jours. Les malades meurent avec un pouls très faible et fréquent (120-140), et avec 50-60 respirations par minute.

Quant à la forme bubonique, elle est tout à fait typique et ressemble beaucoup à l'épidémie observée aux Indes.

Le sérum fut employé dans 10 cas : dans 6 cas l'issue a été mortelle et dans 4 cas la guérison a été complète.

La quantité de sérum injecté variait selon la gravité et l'état plus ou moins avancé de la maladie.

Nous considérons comme très utile de commencer par des fortes doses de sérum (60-80-100 c. c.) injectées d'emblée ; puis,



de répéter les injections 4-5 fois, en tenant compte de la marche de la maladie. Après chaque injection de sérum, on observe un abaissement de la température, le pouls est meilleur, les yeux ne sont plus injectés.

Si la quantité de sérum est insuffisante, la maladie évolue plus lentement, et peut durer jusqu'à 3 semaines. Nous en

avons vu un exemple chez un malade ayant la pneumonie pesteuse : il avait reçu du sérum à plusieurs reprises et aurait certainement guéri si le sérum ne nous avait pas manqué.

Pendant notre séjour en Mongolie nous avons eu l'occasion d'observer une forme de peste que nous n'avons pas vue aux Indes. C'est la forme pustuleuse qui consiste en ceci : à la surface de la peau on voit apparaître de petites vésicules limpides, entourées d'une zone de peau rouge et dure.

Au bout de 24 heures les vésicules se troublent, et on constate alors dans leur intérieur, au microscope, des microbes englobés par les phagocytes.

Deux jours plus tard, apparaît au centre de la pustule une tache noire avec une zone rouge tout autour. Dans 2 cas nous avons pu constater la porte d'entrée de l'infection, et elle ressemblait beaucoup à ces taches.

En ce qui concerne le mécanisme d'infection, il faut l'attribuer surtout aux insectes, comme les mouches, les punaises, les puces et les poux qui ne manquent point dans les ménages chinois.

La carte ci-contre indique la position du foyer de peste mentionné dans ce travail, et celle des autres foyers connus jusqu'ici sur le continent asiatique.

SUR UN NOUVEAU STREPTOTHRIX PATHOGÈNE
(*Streptothrix capræ*)

PAR LE Dr SILBERSCHMIDT
Privat-docent et assistant à l'Institut d'hygiène de Zurich.

Travail du laboratoire de l'Institut d'hygiène de l'Université de Zurich.

Au mois de mai 1867, M. le Professeur Dr Zschokke, directeur de l'Ecole vétérinaire de Zurich, m'apportait deux cultures et des coupes provenant d'un poumon de chèvre. Un vétérinaire avait envoyé le poumon avec le diagnostic de tuberculose ; ce diagnostic s'imposait à l'examen microscopique et fut aussi confirmé par M. Zschokke, d'autant plus qu'il avait vu dans une préparation du poumon, traitée d'après la méthode de Galbet, quelques bacilles colorés en rouge. En examinant les cultures, M. Zschokke fut frappé de rencontrer un microorganisme particulier qu'il n'avait pas encore vu, et voulut bien me confier les cultures pour les soumettre à un examen plus détaillé. Je tiens à remercier M. le Professeur Zschokke de sa grande obligeance.

Des trois cultures reçues le 1er mai, l'une provenait directement du poumon, tandis que les deux autres avaient été inoculées de cultures directes. Elles présentaient du reste, toutes trois (une culture en bouillon, une sur gélose et une sur pomme de terre), un seul et même microbe.

Aspect microscopique du Streptothrix capræ.

Notre Streptothrix n'est pas mobile. Il ne se colore pas toujours de la même manière : en général, les cultures jeunes prennent mieux la couleur. Les couleurs concentrées (fuchsine de Ziehl, violet aniliné), le colorent plus rapidement ; comme les autres microorganismes de cette catégorie, il ne se décolore pas d'après la méthode de Gram (il prend le Gram). Le bleu de méthylène et la thionine colorent plus difficilement, mais per-

mettent plutôt de reconnaître les détails de structure. Dans les organes, la coloration du microbe est beaucoup plus difficile que dans les cultures en divers milieux ; il ne m'a pas été possible de le colorer nettement dans les coupes du poumon de la chèvre et des poumons de lapins. Par contre, j'ai pu étudier la disposition des filaments dans le diaphragme et dans le foie d'un cobaye avec des tubercules superficiels; les coupes avaient été traitées d'après la méthode de Gram et à l'éosine. Cette coloration double, appliquée aux frottis d'organes ou de pus, fournit de très bons résultats.

Le *St. capræ* apparaît soit sous forme de filaments plus ou moins longs, plus ou moins ramifiés et enchevêtrés, soit sous forme de bâtonnets ou de filaments courts avec moins de ramifications. La forme longue se rencontre surtout dans les coupes

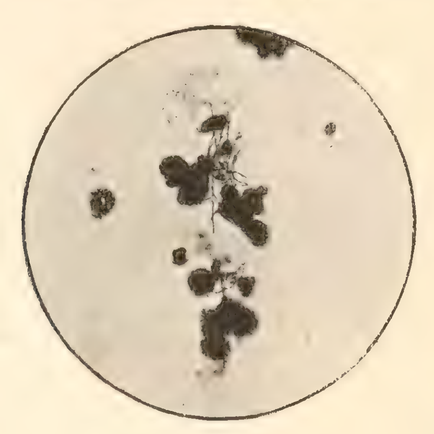


Fig. 1. — *Streptothrix capræ* dans du pus de cobaye.

d'organes, dans le pus (fig. 1), dans les colonies développées dans la profondeur du bouillon, etc. Les cultures jeunes sur gélose et surtout les colonies superficielles discoïdes en bouillon présentent plutôt les formes courtes (fig. 2). Les filaments sont très minces : c'est ce qui rend leur examen en goutte suspendue très difficile.

Sur gélose et à la surface du bouillon, on observe, au bout de 1 à 2 jours de séjour à l'étuve, des filaments plus ou moins longs, plus ou moins ramifiés, composés d'articles inégaux, de 1 à 10 μ de longueur et même plus, nettement délimités par des interstices non colorés ; tous les articles ne sont pas ramifiés et

on ne voit pas plus d'une vraie ramification par article, plus ou moins bien développée. Les filaments se désagrègent très facilement ; plus on étend et plus on répartit la matière à examiner sous la lamelle, plus les filaments paraissent courts. Quelques filaments ramifiés sont comparables aux formes décrites pour le bacille de la diphtérie et pour le bacille de Koch. Les colonies qui se forment dans la profondeur du bouillon (formes longues) se déchirent aussi beaucoup plus facilement que les colonies d'actinomycose, par exemple ; les filaments sont plus ondulés et moins enchevêtrés. Dans des coupes de diaphragme, les filaments, irrégulièrement colorés, se présentent sous forme d'un réticulum à larges mailles occupant toute l'étendue du tubercule.

En examinant les cultures superficielles sur gélose ou en bouillon âgées de quelques jours, on remarque que les formes courtes, bacillaires, prédominent et ont remplacé les filaments plus ou moins ramifiés du début. Plus la culture en bouillon est âgée, moins il y a de formes filamenteuses. Les colonies adhérentes sur milieux solides (gélose et sérum) ne présentent à la surface que des articles courts non ramifiés, tandis que dans la profondeur on trouve encore des filaments plus ou moins ramifiés, quelques-uns avec des renflements, etc. Cette transformation en bâtonnets s'observe dans toutes les cultures superficielles ; les colonies qui se développent dans la profondeur du bouillon restent filamenteuses. Comment expliquer ce changement de forme ? S'agit-il de spores ? Cette opinion me semble plausible. Bien entendu, les spores de notre streptothrix ne sont pas comparables aux spores bactériennes ; ce sont des corpuscules allongés de forme nettement bacillaire, souvent colorés aux deux pôles ; en goutte suspendue, elles ne sont guère plus réfringentes que les filaments ; elles se décolorent assez facilement et ne présentent pas de résistance très prononcée vis-à-vis de températures élevées ; les cultures ont été stérilisées à 70° après une heure et à 80° après vingt minutes (la limite inférieure n'a pas été déterminée). D'autres cultures exposées à la lumière diffuse au laboratoire pendant 7 mois ont pu être réensemencées avec succès. Quant au mode de formation de ces spores, je n'ai pas pu l'étudier exactement. Souvent elles forment des chaînettes ondulées et paraissent provenir d'un filament qui s'est

subdivisé. En outre, elles paraissent réunies par une espèce de membrane ou de capsule non colorée par les procédés usuels ; du moins, c'est ce qui expliquerait leur disposition en chaînette.

Le pléomorphisme de notre streptothrix a aussi été observé dans le pus ; on rencontre parfois dans un frottis de pus des formes rappelant des coccus à côté de bâtonnets et de filaments plus ou moins ramifiés. Inutile de faire remarquer que j'ai toujours vérifié la pureté du pus examiné au moyen des cultures.

Propriétés biologiques du Streptothrix capræ. — Notre microbe pousse bien à la température ordinaire, mieux encore à 33 ou à 37° où les colonies apparaissent déjà au bout de 24 à 48 heures. Les milieux de culture usuels lui conviennent tous, surtout le bouillon sucré et la pomme de terre. C'est un microbe presque essentiellement aérobie ; il ne pousse pas ou presque pas à l'abri de l'air ; en inoculant un tube de gélatine liquéfiée qu'on solidifie ensuite, on s'aperçoit que les colonies dans la profondeur sont beaucoup plus petites qu'à la surface.

Aspect des cultures en divers milieux. 1. *Gélatine.* — La gélatine n'est pas liquéfiée. En cultures sur plaques, les colonies se développent plus ou moins vite, suivant la température ; on distingue une partie centrale, brun foncée, plus dense, et la périphérie plus claire, formée d'une quantité de prolongements très fins, plus ou moins ramifiés, rappelant en plus petit et en plus fin une colonie de moisissure. La colonie devient blanchâtre à sa partie libre. En piqûre, les colonies isolées présentent également un aspect floconneux, tandis qu'à la surface elles forment une couche sèche, brunâtre. Les cultures en gélatine liquéfiée, puis solidifiée après l'ensemencement, présentent des colonies superficielles avec nombreux prolongements périphériques ; un peu au-dessous, les prolongements sont plus courts et les colonies ont plutôt la forme de massues ; dans la profondeur, elles restent toutes petites.

2. *Gélose.* — Je me suis servi presque exclusivement de gélose glycérinée à 4 %. En piqûre, le développement a surtout lieu en surface ; on aperçoit, au bout de deux à trois jours de séjour à l'étuve, une colonie très sèche, verruqueuse, ratatinée, blanc brunâtre, qui se développe encore les jours suivants ; au bout de 8 à 15 jours, la colonie est fortement proéminente, à surface très irrégulière, brun clair, comme saupoudrée d'une couche

blanche, farineuse. Les colonies dans la profondeur sont petites, sphériques, sans aspect caractéristique. — Sur gélose en biais, il se forme une couche sèche, proéminente, brunâtre, saupoudrée de blanc plus tard. Les colonies isolées sont de dimensions variables : elles peuvent atteindre jusqu'à la grosseur d'un pois lorsqu'elles sont très clairsemées. L'aspect de ces colonies est caractéristique : elles sont nettement proéminentes et en même temps adhérentes ; une partie se développe en hémisphère à l'intérieur de la gélose sous forme de prolongements radiés fins, tandis que la partie superficielle est nettement mais irrégulièrement délimitée. Le centre de la colonie est aplati ou renfoncé en cratère : plus tard, le tout prend assez exactement la forme d'une verrue à nombreux replis, desséchée, brun rougeâtre saupoudré de blanc. Une couche blanche, farineuse, peut parfois cacher la vraie teinte de la colonie, tandis que dans d'autres cultures les colonies restent nettement brunâtres.

L'eau de condensation ne se trouble pas ; par contre il se forme, lorsque la culture est abondante, une membrane qui recouvre la surface du liquide qui s'étend encore le long des parois du tube.

A plusieurs reprises, j'ai aussi observé des colonies sphériques plus régulières, blanches d'emblée, sans replis, rappelant l'aspect de très petites colonies de moisissures. A voir ces deux formes de développement, on a peine à croire qu'il s'agisse d'une même espèce microbienne.

3. *Sérum gélatinisé.* — Je me suis servi de sérum de bœuf et de sérum de cheval avec et sans bouillon sucré (sérum de Lœffler) solidifié au-dessous de 80° C. Le développement est beaucoup plus abondant sur sérum de Lœffler, où on reconnait déjà les colonies le 2e jour; ces colonies sont nettement proéminentes, blanc brunâtre, et adhérentes comme sur gélose. Sur sérum de bœuf sans bouillon, la culture apparaît au bout de 4 à 8 jours de séjour à l'étuve sous forme d'une mince couche sèche, légèrement brunâtre, dans laquelle on peut différencier les colonies punctiformes ; à première vue, la culture rappelle un peu celle du bacille de la tuberculose humaine. L'eau de condensation reste claire, mais se recouvre, ainsi que la partie adjacente du tube, d'une membrane formée de petites colonies juxtaposées se désagrégeant très facilement.

4. *Pomme de terre.* — La culture, mince et blanchâtre les 2 premiers jours, devient proéminente et prend une coloration brun-rosé ; les colonies isolées sont rondes, sèches, parfois cratériformes. Elles restent plus petites et moins colorées lorsque le tube est recouvert d'un capuchon de caoutchouc. Dans les cultures abondantes, la couche n'est pas uniforme ; on peut distinguer les diverses colonies à la loupe. La pigmentation est souvent plus prononcée que sur gélose ; plus tard, les cultures aérobies se saupoudrent de blanc.

5. *Bouillon.* — Le bouillon ordinaire et surtout le bouillon sucré (2 0/0) sont très favorables au développement de notre microbe. Les cultures sont déjà visibles au bout de 24 à 48 heures de séjour à l'étuve. Le liquide reste clair, les colonies se développent surtout à la surface sous forme de disques concaves, très minces, secs, blanchâtres, comme saupoudrés ; ces colonies sont de dimensions variables, suivant la quantité de matière inoculée : lorsqu'il n'y en a que 2 ou 3 à la surface du bouillon, elle peuvent avoir un diamètre de 1/2 centimètre et plus. Généralement, elles sont juxtaposées et non enchevêtrées, et forment ainsi une membrane recouvrant toute la surface du liquide et remontant même le long du tube ; cette membrane se désagrège facilement, mais les colonies surnagent en grande partie, même dans les cultures âgées de plusieurs semaines.

Au fond du tube, on ne voit d'abord qu'un dépôt peu abondant, grumeleux ; plus tard, il s'y ajoute quelques colonies qui avaient été superficielles. L'aspect caractéristique de la culture reste le même pendant des mois. A côté de ces cultures typiques, j'ai aussi observé, mais plus rarement, à la surface du liquide, des colonies plutôt sphériques, plus petites, blanches, ressemblant à des moisissures.

En outre, j'ai obtenu, à plusieurs reprises, une culture tout à fait différente de la première : les colonies, au lieu de se développer à la surface du liquide, apparaissent au fond du tube sous forme de petites sphères jaunâtres, comme on les observe dans les cultures de farcin du bœuf et d'actinomycose. A l'œil nu, et aussi à l'examen microscopique, on se croirait en présence d'une forme tout à fait différente ; mais en réinoculant ces colonies, j'ai obtenu la forme typique décrite plus haut. J'avais espéré pouvoir cultiver cette variété observée pour la première

fois dans une culture du pus d'un animal d'expérience, et comparer ainsi deux formes du même microbe : mais, malgré toutes les précautions prises, la forme longue a de nouveau fourni la forme ordinaire. J'ai observé à plusieurs reprises que, réinoculée en bouillon, une seule colonie de forme longue donnait naissance simultanément à des colonies profondes et à des colonies superficielles, discoïdes et sphériques, ces dernières représentant plus ou moins la forme de transition entre les deux autres. C'est en réinoculant une colonie profonde dans le fond du tube au moyen d'un tube de verre effilé que j'ai réussi quelquefois à obtenir une culture de même aspect.

La colonie discoïde paraît être, du moins dans le bouillon ordinaire, celle qui se développe le plus vite et le plus aisément : c'est celle qui fournit les colonies typiques, verruqueuses sur gélose, tandis que les colonies sphériques en bouillon donnent généralement des colonies de même aspect sur gélose.

6. *Eau peptonisée.* — Le bouillon de peptone à 2 0/0 sans viande fournit une culture analogue, mais les colonies restent beaucoup plus petites.

7. *Infusion de paille.* — Le développement des cultures ne se fait qu'au bout de 4 à 5 jours, dans ce milieu acide ; mais, à partir du 5e jour, on aperçoit de belles colonies blanches, isolées ou un peu enchevêtrées qui tombent en partie au fond du tube.

8. *Lait.* — Au bout de quelques jours, revêtement blanc rosé à la surface du liquide ; le lait n'est pas coagulé.

Virulence des cultures. — La virulence du microbe n'a pas été recherchée directement dans le poumon de la chèvre : par contre, j'ai fait de nombreuses expériences sur les animaux avec des cultures jeunes sur gélose, sur pomme de terre et en bouillon, que j'émulsionnais ; les colonies étaient triturées dans du bouillon, au moyen d'une spatule de platine : mais les diverses émulsions n'étaient pas de même concentration, et par conséquent les quantités injectées ne peuvent être indiquées exactement. Les expériences ont été faites sur des lapins, des cobayes et des souris blanches ; je vais en décrire quelques-unes brièvement.

Lapin 1. — 1er mai. Injection intraveineuse d'une petite quantité d'émulsion. — Pas de trouble appréciable. — Le 22 mai (poids 2kg,350), nouvelle injection de 1,5 c. c. d'émulsion.— Le 31 mai (poids 2kg,200), 3e injection

et le 16 juin une 4e. Le lapin ne présente pas de symptômes morbides; il est sacrifié le 26 juin, 10 jours après la 4e injection. A l'autopsie, je note ce qui suit : Rien d'anormal au péritoine et à la rate; le foie présente quelques cicatrices irrégulières au lobe gauche (provenant peut-être de processus inflammatoires ou purulents guéris). Aux 2 reins un petit foyer jaune grisâtre situé d'un côté au sommet d'une pyramide et de l'autre à la limite de la substance corticale. En outre, un abcès lenticulaire et, en un autre point, un renforcement cicatriciel. — Les deux poumons présentent de nombreux foyers de dimensions variables, les uns nettement purulents, d'autres en plus grand nombre ressemblant à des tubercules miliaires. Deux cultures du rein, l'une de l'abcès, l'autre du suc aspiré, fournissent le *St. capræ* en culture pure.

Lapin 2. — 22 mai (poids 1kg,760). Injection sous-cutanée de 1 c. c. de culture en bouillon de 6 jours. 31 mai : tuméfaction de la grosseur d'une noisette au point d'injection (poids 1kg,800). L'abcès reste nettement délimité; le 16 juin il a diminué de volume. Au bout de 4 mois, plus rien. Le 15 octobre, le même lapin reçoit une injection intraveineuse; il n'est pas malade; le 9 novembre (poids 2 kilogrammes), il est sacrifié. A l'autopsie rien d'anormal, sauf quelques lésions (psorospermie ?) au foie.

Vu le résultat inespéré de la première expérience, j'ai sacrifié un autre lapin 10 jours après l'injection.

Lapin 3. — 15. I. Injection intraveineuse de 0,5 c. c. d'émulsion. Sacrifié le 25. I. Autopsie : Tubercules miliaires dans le mésentère, l'épiploon, le péritoine pariétal, la séreuse de l'estomac, etc. ; quelques tubercules au foie, à la rate, aux reins (ces derniers sont plus gros, jaunâtres). Les poumons sont également parsemés de tubercules de grosseur variable. Les cultures des reins, de la rate, du poumon, d'un petit tubercule sous-cutané fournissent le *St. capræ* à l'état de pureté; seule une culture du sang reste stérile. Dans un frottis de la rate, on constate des filaments mal colorés du même microbe.

L'expérience suivante est encore plus concluante ; je me suis servi d'un tout petit lapin.

Lapin no 4. — 28 janvier, poids 1 kg 100. Injection intraveineuse de 5 c.c. d'émulsion. Mort le 4 février, soit au bout de 4 jours. Autopsie : nombreux tubercules à l'épiploon, au mésentère, à la séreuse péritonéale, tubercules bleuâtres aux reins; rate pâle, parsemée de tubercules innombrables ; de même très nombreux tubercules dans les poumons. Les cultures du sang restent stériles; celles de la rate, du rein et du foie fournissent notre Streptothrix à l'état de pureté. — Des coupes histologiques du poumon, examinées avec l'aide obligeante de M. le docteur O. Naegeli, alors 1er assistant de l'Institut pathologique, permettent de constater que les tubercules ressemblent à ceux produits par le bacilles de Koch ; les cellules géantes y sont en assez grand nombre ; ils s'en différencient par le développement et par une caséification plus rapides.

Ces expériences prouvent que le *Streptothrix capræ* est pathogène pour le lapin. En injection sous-cutanée il a produit un abcès; en injection intraveineuse il occasionne la formation de tubercules dans les divers organes. A l'examen histologique, ces tubercules présentent une structure analogue à celle des tubercules dus au bacille de Koch; les tubercules pulmonaires offrent des cellules géantes; ils se caséifient très rapidement.

Souris. Les quatre expériences faites sur des souris blanches n'ont pas fourni de résultats aussi démonstratifs; aucun des animaux n'est mort par suite de l'inoculation. Après l'injection sous-cutanée, on observe une tuméfaction qui finit par abcéder: le pus se résorbe petit à petit; une souris sacrifiée 12 jours après l'injection avait un abcès à pus épais; le streptothrix se retrouva dans les préparations directes et dans les cultures du pus. Deux souris ont supporté l'injection intrapéritonéale d'un demi-centimètre cube d'émulsion.

Cobayes. — Le cobaye s'est montré plus sensible encore que le lapin.

Cobaye 1. — 1er mai. Injection sous-cutanée d'une petite quantité d'émulsion. Au bout de quelques jours, l'abcès formé à l'abdomen se vide par suite d'une morsure du cobaye; le pus ensemencé fournit une culture positive. — Le 22 mai, injection péritonéale; le cobaye résiste.

Cobaye 2. — 10 mai. Injection sous-cutanée d'une culture sur gélose âgée de 10 jours. Abcès et mort le 28 mai. Autopsie: nombreux abcès de tubercules à la paroi abdominale, au mésentère, au diaphragme, au foie, un tubercule au rein, un à la rate; l'épiploon est transformé en un vaste sac de pus. Culture positive.

Cobaye 3. — 31 mai. Poids 300 grammes. Injection sous-cutanée de 0,5 c. c. d'émulsion de culture sur sérum; au bout de 10 jours, l'abcès s'ouvre spontanément et le pus s'écoule à la moindre pression. Les filaments sont visibles dans une préparation du pus. Le 16 juin, l'abcès s'est entièrement vidé; le cobaye a diminué de 25 grammes.

Cobaye 4. — 31 mai. Injection intrapéritonéale d'un c. c. d'émulsion de culture sur gélose. Tuméfaction au point d'injection, puis guérison.

Cobaye 5. — 15. I. Injection intrapéritonéale de 0,5 c. c. d'émulsion. Mort dans la nuit du 20 au 21 janvier (6e jour). Autopsie: abcès au point d'injection. Le foie et la rate sont soudés au péritoine; diaphragme parsemé de tubercules miliaires, nettement délimités et adhérents (dans des coupes histologiques on constate les filaments enchevêtrés dans la substance nécrosée en grande partie). On trouve des tubercules à la surface du foie, au mésentère, dans la séreuse de l'estomac, au péritoine pariétal, etc. Testicules recouverts d'une couche purulente; dans ce pus on retrouve le streptothrix injecté. Quelques

tubercules à la plèvre pariétale; les poumons paraissent normaux; les glandes rétrosternales sont tuméfiées, mais molles: la culture reste stérile. Les cultures de l'abcès sous-cutané du foie et du pus recouvrant les testicules sont positives; celles du sang restent stériles.

Cobaye 6. — 28. I. Injection sous-cutanée d'émulsion. Mort dans la nuit du 2 au 3 février. Abcès très étendu; pas d'autres lésions.

Cobaye 7. — 28. I. Injection intrapéritonéale. Mort le 1er février. Dans le péritoine et à la surface du foie et des reins, surtout au diaphragme, nombreux tubercules; exsudat péritonéal; quelques gros tubercules à la rate, qui est tuméfiée. Culture positive pour la rate et l'exsudat péritonéal; le sang du cœur est stérile.

Comme on le voit par les expériences décrites ci-dessus, le *Streptothrix capræ* est pathogène pour les divers animaux d'expérience; il est capable de former des abcès et des tubercules. Les lésions présentent une certaine analogie avec celles produites expérimentalement par le bacille de Koch et par d'autres microorganismes de la classe des pseudo-tuberculoses.

Afin de m'orienter sur la classification et sur la morphologie du groupe, je me suis livré à quelques études comparatives avec les cultures d'actinomycose, de streptothrix d'Eppinger, du pied de Madura et du farcin du bœuf. Ces cultures proviennent toutes du laboratoire de M. Roux, à l'Institut Pasteur. Elles m'avaient été remises il y a quelques années, et je les ai réensemencées depuis sur gélose tous les 2 ou 3 mois; j'ai eu l'occasion d'en vérifier la pureté à chacun de mes cours. Je les ai soigneusement comparées en les cultivant les unes à côté des autres dans les mêmes conditions, sur bouillon, gélatine, gélose, sérum, pomme de terre. Je n'entrerai pas dans l'étude des particularités toujours un peu contingentes que j'ai pu relever dans cette étude: je me bornerai à en indiquer les résultats généraux dans le tableau comparatif qu'on trouvera ci-après, et qui indique les caractères principaux de la culture de ces 5 actinomyces dans différents milieux. On y trouvera des points de rapprochement, et des caractères de différenciation. Les uns et les autres, très nets dans mes essais, ne se présenteront peut-être pas toujours tout à fait de même, à cause des formes multiples observées chez chacun de ces microbes en particulier, et de leur pléomorphisme tant microscopique que macroscopique.

	ASPECT MICROSCOPIQUE	DÉVELOPPEMENT	CULTURES EN GÉLATINE
Actinomycose.	Longs filaments droits, enchevêtrés, à ramifications nombreuses, presque toutes à angle droit. Coloration assez uniforme. Segmentation et sporulation (?) rares.	Pousse assez lentement, moins bien à l'abri de l'air. — Les cultures aérobies âgées sont jaunes ou même noirâtres.	Liquéfaction lente. Piqûre : colonies floconneuses enchevêtrées.
Pied de Madura.	Filaments assez longs, ondulés, ramifications nombreuses. Coloration souvent irrégulière, en pointillé. Plus tard articles inégaux ; quelquefois renflements terminaux. Pas de spores (?).	Pousse assez lentement, très peu en culture anaérobie. Colonies blanches, puis brunes ou même brun rosé.	Liquéfaction très lente. Piqûre : entonnoir d'évaporation.
Farcin du bœuf.	Formes bacillaires plus fréquente avec renflements terminaux. Ramifications plus rares et plus courtes, coloration irrégulière avec interstices inégaux. Les longs filaments paraissent formés d'articles inégaux. Spores (?) Gaine (?).	Développement un peu plus rapide ; pas de développement à l'abri de l'air. Les cultures ne sont pas adhérentes au milieu. Pigment gris, gris brun ou même rougeâtre.	Pas de liquéfaction.
Strept. Eppinger.	Filaments plus épais, peu ondulés avec rares ramifications, formés d'articles bacillaires plus ou moins longs. A la surface formes courtes, coccobacillaires. Spores (?).	Développement abondant après 24 heures à l'étuve, mais faible en culture anaérobie. Cultures rouge tuile, rarement brunâtres.	Pas de liquéfaction. Développement rapide à la surface, pas dans la profondeur.
Strept. capræ.	Filaments ondulés très minces plus ou moins ramifiés, formés d'articles inégaux qui se déchirent facilement en formes bacillaires. A la surface formes coccobacillaires non ramifiées. Coloration souvent irrégulière. Pléomorphe.	Développement rapide, nul à l'abri de l'air. Cultures brun clair rosé, se saupoudrent de blanc.	Pas de liquéfaction.

GÉLOSE	BOUILLON	LAIT	POMME DE TERRE
Colonies rondes, humides, lisses, blanchâtres, plus tard verruqueuses, squameuses, jaunâtres.	Grandes colonies hémisphériques blanchâtres, au fond et sur le rebord du tube, atteignant jusqu'à la grosseur d'un pois. S'enchevêtrent plus tard. Devel. peu abondant en b. sucré.	Pas de culture apparente.	Développement lent mais abondant. Colonies très pléomorphes.
Petites colonies rondes, plus tard verruqueuses, avec renfoncement. En piqûre, pas de culture dans la profondeur.	Colonies petites, sphériques, floconneuses, isolées ou enchevêtrées, formant plus tard des lambeaux irréguliers au fond du tube. Développement peu abondant en bouillon sucré.	Coagulation. La caséine est redissoute.	Pas de culture apparente.
Très petites colonies gris jaunâtres, à peine visibles, avant 3 à 6 jours, squameuses ou verruqueuses formant une membrane sèche très facile à détacher et à morceler.	Colonies très petites, à peine visibles à l'œil nu, s'enchevêtrant et formant un grumeau au fond du tube. Parfois, surtout en bouillon sucré, membrane à la surface du liquide.	Pas de culture apparente.	Développement abondant. Couche squameuse, grumeleuse.
Colonies rondes, grisatres, se fusionnant de bonne heure pour former une membrane brun, rouge, adhérente, plus ou moins humide.	Développement surtout à la surface, plus abondant du bouillon sucré. Membrane superficielle assez épaisse, formée de colonies fortement enchevêtrées, tombe bientôt au fond du tube et est remplacée par une 2e, 3e, etc.	Couche superficielle brun rougeâtre. Pas de coagulation.	Développement rapide et abondant. La culture aérobie est saupoudrée.
Colonies sèches, proéminentes, aplaties au centre, à surface irrégulière verruqueuse, plissée. Plus tard les colonies se saupoudrent. D'autres fois, colonies hémisphériques blanches, veloutées, semblables à des moisissures.	Recouvrement superficiel formé de colonies discoïdes minces, sèches, juxtaposées, isolées, de dimensions variant suivant leur nombre: pas de membrane cohérente. Dépôt grumeleux. Autre aspect : Colonies sphériques blanchâtres, sèches à la surface, semblables à des moisissures. Autre aspect : petites colonies sphériques au fond du tube.	Couche superficielle rosée. Pas de coagulation.	Développement rapide et abondant. Les colonies rosées paraissent blanches plus tard.

Je donne aussi, comme exemple de quelques-unes de ces différences, des photographies des cultures de quatre de ces microbes dans du bouillon. La fig. 2 se rapporte au *S. capræ*. On y voit les formes courtes et minces dont nous avons parlé plus haut. A côté, et comme contraste, une culture du S. d'Eppinger où les formes rameuses sont très nettes.

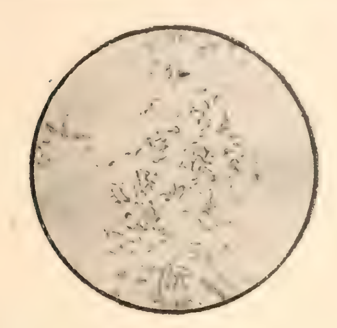


Fig. 2. — Culture en bouillon du *S. capræ*.



Fig. 3. — Culture en bouillon du *S. d'Eppinger*.

Les figures 4 et 5 sont des cultures rameuses et enchevêtrées du *S.* de l'actinomycose et du *S.* du pied de Madura.

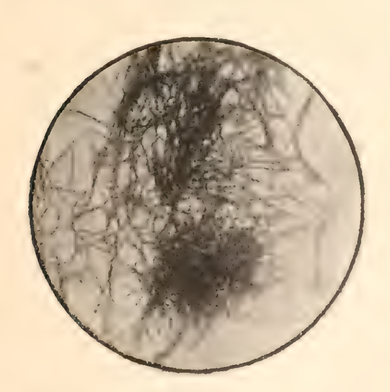


Fig. 4. — Culture en bouillon du microbe de l'actinomycose.



Fig. 5. — Culture en bouillon du microbe du pied de Madura.

Les différences macroscopiques de ces diverses cultures sont inscrites dans le tableau précédent.

RECHERCHES SUR LA PUTRÉFACTION

Par le Dr BIENSTOCK, de Mulhouse.

J'ai décrit en 1884 [1], pour l'avoir rencontré dans l'intestin, un bacille formant sa spore en baguette de tambour, et qui, ensemencé sur de la fibrine, la liquéfie et la putréfie en donnant naissance aux produits connus de la putréfaction des matières albuminoïdes, et même en dédoublant les plus simples, telles que la tyrosine et la leucine. Ce bacille dépassant sous ce point de vue tous ceux que j'avais alors à ma disposition, j'ai cru devoir en faire un facteur spécifique de la décomposition des matières albuminoïdes.

Si l'on en croit les livres classiques et les mémoires spéciaux peu nombreux publiés sur ce sujet (Hauser 1885 [2], Nencki et Sieber 1889 [3], Kerry 1889 [4], Bovet 1890 [5], Sanfelice 1890 [6], Kuhn 1891 [7]), il y aurait un grand nombre de bactéries jouissant des mêmes propriétés et capables d'amener dans la matière albuminoïde des dédoublements profonds et variés. Mais de cette liste il faut sûrement éliminer d'abord des bacilles aérobies qui ne peuvent pas prendre part, sinon superficiellement, à des procès de putréfaction véritables ; puis tous ceux qui, après avoir développé des produits à odeur putride, s'arrêtent à moitié chemin et disparaissent de la masse avant même qu'elle soit liquéfiée. Quand on a fait cette élimination, on voit qu'il ne reste guère que :

1o Les microbes anaérobies étudiés par Kerry, Nencki et Bovet (Bacille de l'œdème malin, du charbon symptomatique. *Bacillus liquefaciens magnus et spinosus* [Luderitz]) ;

2o Les Proteus étudiés par Hauser et Kuhn, et dont le rôle dans la putréfaction est encore douteux ;

3o Le *Bacillus putrificus coli* que j'ai décrit.

1. Bienstock. Ueber die Bakterien der Fœces. *Zeitschr. f. klin. Med.*, t. VIII, 1884.
2. Hauser. *Ueber die Faulniss*, etc., Leipzig, 1885.
3. Nencki. *Sitzungsber. d. Kaiserlich. Acad. d. Wien.*, Wien, 1889.
4. Kerry. *Wiener Monatshefte fur Chemie*, t. X, 1889.
5. Bovet. *Ann. de micrographie*, 1890, no 7.
6. Sanfelice. *Att. d. Acad. Med. di Roma*, xvie année, série II, vol. V.
7. Kuhn. *Archiv. f. Hygiene*, t. XIII, 1891.

Ce dernier bacille n'a pas été retrouvé par d'autres chercheurs, et je n'ai bien compris cet insuccès qu'au moment où, voulant le ressaisir, je ne l'ai plus retrouvé moi-même. J'avais été ramené à lui par l'espoir de faire disparaître, en l'étudiant plus à fond, quelques-unes des incertitudes que je viens de viser brièvement. Les moyens dont dispose un médecin ne sont pas du tout comparables à ceux des grands Instituts bactériologiques, et j'ai été obligé de tâtonner longtemps. Mais j'ai enfin réussi, et ce sont les résultats de cette étude que je voudrais exposer.

Entendons-nous bien d'abord sur la signification du mot putréfaction. C'est pour moi l'ensemble des transformations que subit la matière organique après la mort, et qui consistent d'abord en une destruction physique de la forme et de la contexture, puis en une décomposition chimique de ses éléments complexes.

De là résulte une première conclusion. C'est que chacun des éléments des tissus aura son mode ou ses modes de putréfaction, comme chaque substance ternaire a son mode ou ses modes de fermentation. Il n'est même pas sûr que l'albumine ait les mêmes ferments que la caséine ou la fibrine. Il faut donc particulariser de suite. J'ai choisi la fibrine, qu'il est facile de préparer pure par battage du sang, et qui se présente sous la forme de filaments solides facilement attaquables. Cette fibrine, pour devenir assimilable, doit d'abord perdre la consistance solide et devenir soluble. C'est en général une affaire de diastases. Cette liquéfaction est le premier acte de la putréfaction. Elle peut du reste la précéder ou l'accompagner. Mais elle en est la condition préalable.

Liquéfiée, cette fibrine subit, suivant le microbe qui l'attaque, des dédoublements variés, qui peuvent comprendre divers termes parmi les produits qu'on a appelés produits putrides, et qui ne les comprennent pas nécessairement tous. Chaque microbe doit donner les siens, de même que chaque ferment des sucres peut en tirer ses dérivés spéciaux. Parmi ces produits putrides, quelques-uns pourront se trouver communs à un grand nombre de microbes, de même que l'acide carbonique, l'hydrogène sont communs à un grand nombre de ferments des matières ternaires. Ce sont évidemment les plus simples ou les plus stables : la leucine, la tyrosine, l'ammoniaque, les acides gras sont au premier rang parmi ces derniers.

Par contre, nous devons retrouver dans la putréfaction, c'est-à-dire dans la fermentation anaérobie des matières albuminoïdes, des corps du même ordre que les alcools dans la fermentation anaérobie des substances ternaires, c'est-à-dire des corps qui ne peuvent plus subir, bien qu'ils aient encore une composition complexe, de dédoublement anaérobie, de sorte que si la putréfaction est nécessairement et par essence un processus de dédoublement, il pourra arriver dans certains cas que ce dédoublement ne soit pas poussé très loin.

C'est ici que commence la difficulté de la solution du problème, car nous connaissons très peu la constitution de la matière albuminoïde et celle de ses premiers produits de dédoublement. La limite entre la fibrine ou l'albumine et leurs peptones est fort indécise. Y a-t-il simplification de la molécule pour passer de l'une à l'autre, ou simplement changement dans le mode d'agrégation ? On ne le sait pas d'une façon bien précise. On peut pourtant dire, vu la faible distance qu'il y a entre ces deux termes, qu'une action de putréfaction sera d'autant plus puissante qu'il restera moins de peptones. Mais je crois bien que si l'on ne comptait comme bacilles de la putréfaction que ceux qui n'en laissent pas du tout, il n'en resterait plus aucun.

Cela posé, mon plan de travail était très simple : 1° examiner dans leur effet sur la fibrine les diverses espèces de microbes dont on admet qu'elles ont quelque rapport avec la putréfaction ; 2° essayer d'isoler le ou les agents de la putréfaction de la fibrine en décomposition spontanée.

1° *Étude des bactéries de la putréfaction.* — J'ai ensemencé, dans un liquide nutritif additionné de fibrine et faiblement alcalin, 24 espèces différentes de microbes aérobies et anaérobies facultatifs auxquels, dans les travaux que j'ai énumérés, avait été attribué un rôle dans la putréfaction. Après 8 jours passés à la température ordinaire, suivis d'un séjour de quelques semaines à l'étuve à 37°-40°, on a examiné les cultures.

Ont laissé la fibrine intacte en troublant un peu le liquide et en lui donnant des odeurs faibles, non putrides : *Proteus vulgaris* (3 races) ; *Proteus mirabilis* ; *Proteus Zenkeri* ; *Bacillus fluorescens liquefaciens* et *putidus* ; *Bac. pyogenes fœtidus* ; *liquefaciens* ; *Bacillus ureæ* ; *Bac. subtilis* (pellicule à la surface) : *Bac. butyricus* Hueppe (Id.); Bacille du rouget du porc, du lait bleu ; *B.*

prodigiosus; *B. coli*; *Bac. aerogenes lactis*: trois bacilles retirés de la boue; *Spirillum Finkleri*; *Spirillum tyrogenum* Denecke; *Staphylococcus pyogenes aureus*; Diplococcus de l'air; *Sarcina aurantiaca*; *Sarcina rubra*.

Les bacilles de la boue et le diplococcus de l'air venaient de mon laboratoire, les autres provenaient des Instituts bactériologiques de Strasbourg et de Fribourg, du laboratoire de Kral, à Prague. On voit qu'aucun n'a donné de putréfaction véritable, et n'a même amené de liquéfaction commençante de la fibrine. J'ai eu beau varier les essais, rendre la réaction acide ou alcaline, changer les milieux nutritifs (eau avec 0,5 0/0 de NaCl, urine, liquides de Cohn, d'Uschinsky-Fraenkel), les résultats n'ont pas varié. Cependant le liquide de Fraenkel (eau 1,000 grammes, asparagine 4 grammes, phosphate bipotassique 2 grammes, lactate d'ammoniaque 6 grammes, NaCl 5 grammes, alcalinisé) s'est toujours montré le meilleur.

Beaucoup d'autres essais faits en empruntant une semence à des morceaux de viande en putréfaction, à des fèces, des terres, de la boue, n'aboutirent pas mieux. J'en conclus que les bacilles qui président à la putréfaction de la fibrine sont plus rares qu'on ne pense. J'en conclus aussi que mon bacille en baguettes de tambour n'est pas aussi répandu que je l'avais cru.

J'ai fini par le rencontrer en ensemençant un tube à fibrine avec de la sanie provenant d'un muscle liquéfié totalement, et en putréfaction spontanée depuis plus d'un an sous une cloche de verre. Toutes les fois qu'il était abondant dans la culture, la fibrine se dissolvait et se décomposait très vite, et je fus conduit ainsi à essayer de l'isoler.

Tous mes essais en culture aérobie échouèrent, et je ne suis arrivé à un résultat qu'en tâtonnant par le procédé suivant. Quand j'avais, par une série d'ensemencements successifs, accru dans les cultures le nombre des bacilles en baguettes de tambour, je les portais à 80° pendant 1 heure et demie à 2 heures. Remise dans l'étuve à 37°-40°, la culture reprenait. Elle était débarrassée de tous ses microbes aérobies, car, ensemencée sur plaques de gélatine, elle ne donnait pas de colonies, mais elle ne donnait rien non plus quand on l'ensemençait sur de la fibrine fraîche.

C'était sans doute une question d'aération. En essayant alors

d'une culture dans de la gélatine glucosée en épaisseur, j'obtins à moitié hauteur de la couche, et dans des conditions d'anaérobiose, le bacille en cultures pures. C'est avec le liquide originel, la sanie du muscle liquéfié et putréfié sous cloche de verre, que j'ai réussi le mieux et le plus vite.

Morphologie du bacille. — Pas de culture aérobie sur gélatine, gélose, sérum solidifié, etc. En culture anaérobie, avec l'appareil de Novy ou celui de Klein[1], la culture se fait en 3 ou 4 jours. En piqûre dans de la gélatine glucosée alcaline, après 3 ou 4 jours à 15°-20°, on voit une série de colonies qui, une fois formées, ne poussent plus dans les couches superficielles, tandis que dans les couches profondes elles donnent des bulles troubles, liquides, qui confluent avec dégagement gazeux, et amènent une liquéfaction complète. Seule la couche superficielle, épaisse de quelques millimètres, reste solide; puis il se forme un dépôt qui se concrète avec le temps et devient difficile à disloquer.

Sur gélose glucosée, inoculée en piqûre, l'accroissement commence à environ 1 centimètre au-dessous de la surface sous forme d'un cône opaque, effilé, s'élargissant vers le bas. Puis tout devient trouble sous une couche de 3 millimètres à la surface. La gélose est disloquée par le dégagement gazeux.

Le développement est aussi abondant sur gélatine et gélose non glucosées. Il est plus lent, quand le milieu est acide.

C'est un bâtonnet mince, à extrémités arrondies, de 5 à 6 μ de longueur. Il se développe parfois en filaments. La formation des spores est terminale. Pour les avoir belles et grosses, donnant au bacille l'aspect de baguettes de tambour, il faut faire à 40° des cultures en piqûre fraîche sur gélose non glucosée, ou examiner de vieilles cultures en piqûre sur gélose glucosée, ou des cultures anaérobies en strie sur gélose, ou dans du sérum solidifié. La spore commence par un renflement qui devient de plus en plus réfringent et s'isole ensuite à la façon ordinaire, après être restée quelque temps adhérente au bâtonnet par une attache invisible qui lui permet pourtant d'en suivre tous les mouvements.

Ce bacille est en effet très mobile. La méthode de Lœffler, appliquée à des cultures fraîches en strie sur gélose, permet d'y découvrir des cils embroussaillés. Il se colore facilement par les couleurs usuelles d'aniline, quand il est jeune. Il prend

1. Klein. *Centralbl. f. Bakt.*, t. XXIV, p. 967.

le Gram. Les spores supportent bien un séjour de 2 heures à 80° et même une ébullition de 3 minutes, sans affaiblissement apparent. Elles sont mortes après 5 minutes.

Le microbe n'est pas pathogène pour les animaux, ainsi qu'a bien voulu s'en assurer M. le professeur Lévy, de l'Institut hygiénique de Strasbourg, que je remercie de sa complaisance.

Action sur la fibrine. — Reste à étudier l'action de ce bacille sur la fibrine. Je l'ai ensemencé pour cela dans des tubes contenant de la fibrine débarrassée autant que possible d'albumine, et maintenus dans l'appareil à cultures anaérobies. Dans ces conditions, qui ne rendent pas l'anaérobiose certaine, tous les tubes ne se peuplent pas. Mais il y en a toujours où la fibrine se dissout, où le liquide devient trouble, avec dégagement gazeux dans lequel il est facile de découvrir de l'hydrogène sulfuré. A 37-40°, le phénomène est en pleine marche au bout de 3 ou 4 jours. Le liquide ne montre au microscope que des bacilles mobiles, avec ou sans leurs spores caractéristiques. L'odeur, très désagréable au début, devient peu à peu plus aromatique. Après 2 ou 3 semaines le liquide commence à se clarifier. A aucun moment je n'ai pu saisir la réaction de l'indol.

Il est bien entendu que, comme avec tous les bacilles anaérobies, on peut obtenir un développement dans un liquide aéré par un ensemencement copieux. Le liquide est alors désaéré de place en place et peut être complètement envahi, même dans ses couches superficielles, quand le dégagement de gaz dont il devient le siège le protège contre le contact de l'air extérieur. J'ai profité de cela pour faire putréfier de la fibrine dans de grands ballons destinés à une étude chimique. Après y avoir introduit un litre de solution nutritive et 100 grammes de fibrine, je stérilisais d'abord à la manière usuelle, puis je faisais bouillir 2 heures pour bien en chasser l'air. Au moment de la pleine ébullition, je fermais avec un capuchon de caoutchouc bien serré, je refroidissais à 40°, et j'ensemençais rapidement, puis je remettais le caoutchouc. Quelquefois ces ballons se troublaient à l'étuve, et quand la putréfaction de la fibrine y avait commencé, on pouvait en enlever le capuchon. J'ai aussi employé des ballons d'où l'air avait été chassé par un courant de CO^2. Pour être bien assuré que l'expérience était bonne, je ne soumettais à l'analyse

que les ballons dont le contenu ne donnait pas de culture en strie sur gélose à l'air.

Les analyses ont été faites par M. J.-J. Wallach, élève de l'École de chimie de Mulhouse, auquel j'adresse mes meilleurs remerciements pour son obligeance. Je résume un de ses protocoles qui indique le mode opératoire employé.

a. 100 grammes de fibrine dans un demi-litre de liquide de Cohn, 8 jours de putréfaction. Liquide trouble, alcalin. Dépôt assez fort. A la surface, quelques flocons de fibrine. Distillation aux 3/4.

A. Liquide distillé acidulé avec HCl; il se dégage H^2S. On clarifie avec du sulfate de cuivre et on filtre. On traite par l'éther qui, séparé et évaporé, puis traité par un peu de soude caustique, ne donne pas de précipité avec l'eau de brome, et ne contient par suite pas de phénol.

Le liquide traité par l'éther est évaporé et laisse une matière huileuse qu'on distille dans un courant de vapeur d'eau. Le liquide distillé, épuisé par l'éther en présence d'un peu de soude, fournit un produit donnant la réaction de *l'isonitrile*, et contenant par conséquent des amines. On n'y trouve ni indol, ni scatol.

B. Le résidu de A est concentré, en présence de $NaCO^3$, et traité par l'alcool qui laisse insoluble de la peptone, caractérisée par la réaction du biuret. Le liquide alcoolique évaporé laisse un résidu qui, repris par l'eau acidulée par SO^4H^2, dégage l'odeur caractéristique des acides butyrique et valérianique. Ce résidu ne contient plus de peptone, mais on y trouve de la leucine au microscope.

Le résidu du traitement alcoolique est alcalinisé avec de la soude caustique, traité par le chlorure de baryum, filtré, acidulé avec de l'acide chlorhydrique, et épuisé par l'éther, qui enlève des acides gras et aromatiques qu'on élimine en distillant dans un courant de vapeur d'eau surchauffée. Le résidu resté dans le ballon de distillation dépose une substance résineuse. On filtre, on concentre. Il ne se forme pas d'acide scatolcarbonique. On acidule avec l'acide sulfurique et on extrait à nouveau avec de l'éther qu'on évapore et qui laisse un peu de matière qu'on traite par la benzine bouillante. Celle-ci laisse déposer des cristaux fondant à 114°, et qui sont de l'acide paraoxyphénylpropionique.

b. Un second ballon traité de même a donné H^2S, de la peptone, de la leucine, de la tyrosine, des acides gras et aromatiques, des amines, et de l'acide paraoxyphénylpropionique.

Ceci répond à deux des questions que je m'étais posées. Ce bacille peut donner une putréfaction véritable, et il la donne dans des conditions purement anaérobies.

Comment donc peut-il y présider dans les conditions ordinaires, par exemple sur le morceau de viande, exposé à l'air, qui m'en avait fourni la semence? L'idée me vint tout natu-

rellement que c'était grâce à la présence d'autres bactéries aérobies, et je me trouvai conduit à examiner sous ce rapport les 24 sortes de bacilles aérobies que j'avais trouvés sans action sur la fibrine quand je les ensemençais à l'état pur. Je fis alors des ensemencements mixtes dans des conditions très variées, dont l'exposé m'entraînerait trop loin. Je dirai seulement que l'expérience m'a permis de faire trois catégories :

1° Avec 20 des espèces énumérées plus haut, mon bacille, que j'appellerai désormais *Bacillus putrificus*, se développe toujours lorsque, après l'avoir ensemencé sur de la fibrine dans un tube à essai, on ensemence ensuite une de ces espèces. Le commencement de la putréfaction se fait à une époque variable suivant l'espèce, assez constante pour chacune d'elles. A 37° par exemple, il faut, pour l'apparition des premiers gaz fétides, environ 16 heures avec mon bacille n° 3 tiré de la boue ; 20 heures avec le *Spirillum Finkleri*, le *Sp. tyrogenum*, le bacille du rouget des porcs, le bacille II de la boue : 25 heures avec les *Bacillus subtilis* et *Bacillus fluorescens liquefaciens* ; 30 heures avec le *Sarcina aurantiaca* ; 35 heures avec *Proteus vulgaris*, *Bacillus butyricus* Hueppe, *Bacillus pyogenes fœtidus*, *Bacillus prodigiosus*, *Staphylococcus pyogenes aureus* ; 40 heures avec le bacille I de la boue, et 3, 4 et 5 jours avec *Bacillus ureae*, le bacille du lait bleu, *Proteus Zenkeri*, *Diplococcus* de l'air, *Proteus mirabilis*, et *Bacillus fluorescens putidus*.

Ces inégalités sont une fonction complexe de la composition du milieu nutritif, de la vitesse de développement des espèces aérobies, de la rapidité avec laquelle elles absorbent l'oxygène. Quelques-unes de ces espèces agissent aussi en modifiant pour leur compte le milieu qui se putréfie ; c'est ainsi qu'avec elles on voit apparaître l'indol, absent dans la culture pure de *Bacillus putrificus* et dans les autres cultures mixtes. Tel est le cas pour *Spirillum Finkleri*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus butyricus* Hueppe, *Bacillus pyogenes fœtidus*. Dans aucun cas on n'aperçoit le *Bacillus putrificus*, avant que la putréfaction ait commencé :

2° Une seconde catégorie est faite de deux habitants de l'intestin de l'homme, *Bacillus coli* et *Bacillus lactis aerogenes*. 5 à 6 heures après l'ensemencement mixte, au plus tard un jour après, le liquide montre beaucoup de formes en baguettes de tambour ; mais il n'y a ni dégagement de gaz ni putréfaction, et la fibrine reste même parfois intacte. Sept races de *bacillus*

coli m'ont donné les mêmes résultats. Nous allons revenir sur les causes de cette inertie.

3° Enfin, dans une 3e catégorie faite de *Bacillus violaceus* et *Sarcina rubra*, il n'y a eu, dans l'ensemencement mixte, ni putréfaction, comme dans la 1re catégorie, ni développement du *Bacillus putrificus*, comme dans la seconde.

Les produits des putréfactions avec les microbes de la 1re catégorie sont tantôt des produits normaux, tantôt ils sont un peu différents, ainsi qu'en témoignent les analyses suivantes :

c. Ballon contenant 50 gram. de fibrine dans un 1/2 litre de liquide d'Uschinsky-Fraenkel, et ensemencé avec *Bac. putrificus* et *Bac. fluorescens liquefaciens*, étudié après 4 semaines : peptones, leucine, amines, acides gras et aromatiques, acide paraoxyphénylpropionique.

d. Ballon contenant 100 grammes de fibrine dans 1 litre de liquide d'*Uschinsky-Fraenkel*, ensemencé avec *Bac. putrificus* et *Proteus vulgaris*, étudié après 4 semaines : peptones, leucine, amines, acides gras et aromatiques, indol, acide scatolcarbonique, acide paraoxyphénylpropionique.

Il faut donc conclure que si certains aérobies n'interviennent que pour désaérer la culture et y rendre possible le développement de *Bac. putrificus*, d'autres amènent pour leur part des transformations dans la fibrine dissoute.

C. — *Étude de bactéries anaérobies de la putréfaction*. — Il existe sûrement beaucoup d'autres bacilles que le *Bac. putrificus*, capables de produire des putréfactions très intenses. Tel est le bacille de l'œdème malin, étudié par Kerry (*l. c.*) et qui, avec l'albumine, a donné des acides gras, de la leucine, de l'acide hydroparacoumarique, une huile puante soluble dans l'éther et de composition $C^8 H^{16} O^4$, de l'hydrogène et du méthane. Nencki (*l. c.*), avec le bacille du charbon symptomatique et deux autres anaérobies moins connus, a obtenu, avec l'albumine du sérum, des acides gras et aromatiques, de l'acide hydroparacoumarique, phénylpropionique et scatolcarbonique.

J'ai essayé l'action qu'exercent sur la fibrine les bacilles de l'œdème malin et du charbon symptomatique, auxquels j'ai adjoint le bacille du tétanos, le *Bac. pseudo-œdematicus* Liborius, le *Bac. enteridis sporogenes* Klein, et le *Clostridium fœtidum*. J'ai étudié ces bacilles, comme le *Bac. putrificus*, en cultures anaérobies, aérobies et mixtes avec les bacilles aérobies cités plus haut. J'ai vu ainsi que les résultats annoncés par Kerry et

Nencki pour l'albumine se reproduisaient avec la fibrine. Le bacille de l'œdème malin et celui du charbon symptomatique font putréfier la fibrine à l'égal du *Bac. putrificus* en culture anaérobie, aussi bien qu'en infection mixte. Quant aux 4 espèces dont j'avais aussi entrepris l'étude, une seule, le *Clostridium fœtidum*, a donné une putréfaction de fibrine, un peu moins active qu'avec le *Bac. putrificus*, mais aboutissant aux mêmes résultats, ainsi que le montre l'analyse suivante :

e. Ballon contenant 100 grammes de fibrine dans un litre de liquide d'Uschinsky-Fraenkel, ensemencé avec le *Clostridium fœtidum*, et laissé 3 semaines à l'étuve : H^2S, CO^2 : peptone, amines, corps aromatiques, acides gras, leucine, acide paraoxyphénylpropionique.

l. Ballon identique ensemencé avec *Clostridium fœtidum* et *spirillium* Finkler-Prior : H^2S, CO^2, peptones, leucine, acides gras, amines, indol, acides paraoxyphenylpropionique.

En résumé, la putréfaction de la fibrine ne semble pouvoir être produite que par l'action de bactéries anaérobies, comme le montrent les exemples du *Bac. putrificus* et du *Clostridium fœtidum*, que j'ai le premier donnés, joints à ceux des bacilles de l'œdème malin et du charbon symptomatique, donnés par Kerry et Nencki. Les bacilles aérobies semblent incapables de provoquer ce phénomène, et si on les y rencontre, c'est que, conformément aux idées de Pasteur, ils servent à y créer un milieu désoxydé propre à l'évolution des bactéries anaérobies.

Ces idées de Pasteur ont toujours été acceptées par son École. On les trouve contestées dans les traités classiques de C. Fraenkel et de Flugge, dont je partageais l'opinion, lorsque, en 1884, je décrivais le *Bac. putrificus* comme un véritable aérobie capable de faire putréfier l'albumine. C'est qu'à ce moment je n'avais pas le microbe en culture pure : il était associé à un microbe aérobie et formant de l'indol, que je trouvais alors et que je ne trouve plus aujourd'hui.

J'appelle, en terminant, l'attention sur le fait observé plus haut avec les bacilles de l'intestin qui gènent ou arrètent la putréfaction de la fibrine. Ce phénomène de l'arrèt de la putréfaction par les deux bacilles éclate plus distinctement encore dans le lait.

On sait depuis longtemps que le lait non bouilli empèche

la putréfaction[1], et on en a attribué la cause au lactose[2].

Eh bien, j'ai trouvé que le lait stérilisé, loin de gêner la putréfaction de la fibrine, la favorise. De la fibrine dans du lait, stérilisée et ensemencée avec le *Bac. putrificus*, soit pur, soit mélangé avec les 20 espèces aérobies, mentionnées plus haut, se décompose rapidement.

Au contraire, en infection mixte avec le colibacille ou le *Bac. aerogenes lactis*, le lait stérilisé se comporte envers le *Bac. putrificus* tout comme le lait non bouilli. La fibrine ne s'y putréfie pas, ce qui me fait conclure que l'agent antiputride du lait non bouilli n'est pas le lactose, mais la force antagoniste de ces deux bacilles qu'on y rencontre toujours.

Ce fait me paraît devoir être rapproché de cet autre que la décomposition du contenu de l'intestin normal ne va jamais aussi loin que celle de la fibrine ou de l'albumine putréfiées hors du corps animal, ce qui est sûrement dans l'intérêt de l'organisme.

On a attribué la restriction de la putréfaction intestinale à la résorption continue, aux hydrocarbures, aux acides de la bile, mais un traité classique paru tout récemment[3] conclut qu'on n'est sûr de rien.

Il me semble qu'on pourrait utilement chercher une explication du côté de l'influence des bacilles du colon ou du *Bac. lactis aerogenes*, et chercher de quoi est faite la force antagoniste que ces bacilles opposent à l'énergie d'une au moins des bactéries les plus actives de la putréfaction. C'est ce que je me propose de faire[4].

1. WINTERNITZ, *Zeitschrift. f. physiol. Chemie*, XVI, p. 461.
2. SEELIG, *Virchow's Archiv*. 1896, 146, p. 65.
3. OLOF HAMMARSTEN, *Physiol. Chemie*, *Wiesbaden*, 1899, p. 304.
4. Ce mémoire est un résumé d'un travail, publié *in-extenso* chez Oldenbourg, à Munich, dans les *Archives pour l'Hygiène*.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

13me ANNÉE DÉCEMBRE 1899 N° 12

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LA PESTE BUBONIQUE

ÉTUDE DE L'ÉPIDÉMIE D'OPORTO EN 1899

SÉROTHÉRAPIE

PAR

A. CALMETTE ET A.-T. SALIMBENI
Directeur de l'Institut Pasteur de Lille. Préparateur à l'Institut Pasteur de Paris.

I

Depuis les grandes épidémies qui ravagèrent une partie de l'Europe au siècle dernier, la peste était restée à peu près exclusivement localisée dans quelques provinces du sud de la Chine et dans les vallées septentrionales de l'Himalaya. Elle ne faisait plus que de rares incursions vers la Mongolie, le Turkestan, la Perse, la Mésopotamie et sur les rives de la mer Caspienne et de la Volga.

En Afrique, on la supposait disparue depuis la dernière épidémie d'Égypte en 1844; mais M. Koch a récemment découvert qu'un foyer permanent subsistait encore au voisinage des grands lacs, à Kisiba, dans l'Ouganda.

Tout à coup, en 1894, on apprit que la maladie avait été importée dans l'île de Hong-Kong, probablement par des barques chinoises de la rivière de Canton, et qu'elle y faisait un très grand nombre de victimes.

Le Gouvernement français et l'Institut Pasteur se préoccu-

pèrent immédiatement d'étudier les moyens d'empêcher la contamination de nos importantes possessions indo-chinoises. C'est alors que Yersin se rendit à Hong-Kong, pour y entreprendre des recherches bactériologiques. On connaît les résultats de ses travaux, qui aboutirent à la découverte du microbe spécifique, découverte qui fut d'ailleurs effectuée presque en même temps par le savant japonais Kitasato.

Sans attendre le retour de Yersin, l'Institut Pasteur, envisageant la possibilité d'un retour offensif de la peste vers l'Europe, se mit en devoir de chercher une méthode de vaccination et de sérothérapie antipesteuses. Sous la direction de notre maître, le Dr Roux, l'un de nous entreprit avec Borrel, et plus tard avec Yersin, l'étude expérimentale du microbe, et la préparation d'un sérum préventif et curatif de la peste chez les animaux de laboratoire sensibles à cette affection [1].

Cette étude fut continuée sans interruption dans le laboratoire du Dr Roux, par Yersin, Batzaroff, Salimbeni, Dujardin-Beaumetz.

En 1895, on commença à immuniser des chevaux, en vue d'obtenir de grandes quantités de sérum. Les méthodes d'immunisation durent être modifiées à diverses reprises. Le premier sérum employé par Yersin à Canton, puis à Amoy, en 1896, avait donné d'excellents résultats. Il provenait d'un cheval qui avait reçu dans les veines des quantités croissantes de cultures, sur gélose, de bacilles pesteux vivants [2].

Ce sérum fut employé par Yersin pour le traitement de vingt-six malades, dont trois à Canton et vingt-trois à Amoy.

Deux seulement succombèrent, de sorte que la mortalité qui, sans traitement, s'élevait à cette époque à 90 0/0, s'abaissa ainsi chez les individus traités à 7,6 0/0.

En raison des dangers que présentaient pour certains animaux et pour les expérimentateurs les injections de bacilles vivants et virulents, on se décida à tenter l'immunisation des chevaux, soit avec des toxines extraites des corps microbiens et des cultures en milieux liquides, soit avec des cultures tuées par la chaleur.

1. Yersin, Calmette et Borrel, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1895, p. 589.
2. Metchnikoff, Congrès de Moscou, août 1897, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 737, 1897.

Le sérum obtenu par ces procédés prévient et guérit la peste expérimentale, à condition d'être employé à haute dose, mais l'application qui en a été faite en 1896 et en 1897 dans l'Inde, par Yersin d'abord, puis par Simond, montra qu'il était insuffisamment actif pour le traitement de la maladie chez l'homme. Il réduisait la mortalité à 50 0/0 environ, au lieu de 80 0/0[1].

Les expériences de Yersin et Simond ont été suivies par la Commission allemande et par la Commission autrichienne pour l'étude de la peste dans l'Inde. Ces deux commissions, dans leurs rapports, concluaient que les résultats constatés à cette époque ne permettaient pas d'affirmer l'efficacité curative du sérum.

L'extension progressivement croissante de la peste dans l'Inde d'abord, puis successivement à Madagascar, à l'île de la Réunion, en Arabie, en Égypte, à l'île Maurice, et, par la voie de terre, du côté de la Sibérie méridionale et du Turkestan russe jusque sur les rives de la Volga, devenait une menace telle pour l'Europe que l'Institut Pasteur résolut de préparer quelques chevaux vaccinés contre les cultures de peste tuées par la chaleur, en leur injectant plusieurs fois ensuite des cultures vivantes et virulentes, comme cela avait été fait en 1894-1895 lors des premiers essais.

Sur ces entrefaites, au mois d'août 1899, le Gouvernement français fut informé de l'apparition de la peste à Oporto.

L'Institut Pasteur jugea immédiatement nécessaire d'envoyer une mission en Portugal pour y étudier le développement et la marche de l'épidémie, et pour y expérimenter la valeur préventive et curative du sérum antipesteux.

Ayant eu l'honneur d'être chargés de cette mission, dès notre arrivée nous nous mîmes en rapport avec les autorités portugaises, qui nous donnèrent toutes facilités pour remplir notre tâche. Nous devons des remerciements particuliers à S. Exc. M. Luciano de Castro, président du Conseil et ministre de l'Intérieur du Portugal, à MM. les D[rs] Ricardo Jorge, directeur des services d'hygiène de la ville d'Oporto, et Nogueira, directeur de l'hôpital des pestiférés à Bonfim, qui nous ont ouvert les portes

1. Metchnikoff, Congrès de Moscou, 1897, Sur la peste bubonique, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 737, 1897. — Simond, Rapport sur les cas de peste traités dans l'Inde par le sérum antipesteux, *Annales d'hygiène et de médecine navales*, août-septembre 1898, p. 349.

de leurs services et qui nous ont prêté constamment leur concours le plus empressé et le plus dévoué.

Nous devons également rendre hommage à la mémoire du docteur Camara Pestana, directeur de l'Institut bactériologique de Lisbonne, mort victime de son dévouement à la science au cours de cette épidémie. Ce jeune savant, avec ses deux assistants, MM. Carlos França et Resende, a collaboré à nos travaux jusqu'au jour où il fut lui-même atteint de la peste. Nous relaterons plus loin les tristes circonstances dans lesquelles il a succombé.

Nous tenons aussi à remercier M. Delcassé, ministre des Affaires étrangères, et les représentants de la République française en Portugal : MM. Rouvier, ministre de France à Lisbonne, Outrey, consul de France, et Crouzet, chancelier du consulat de France à Oporto, à l'obligeance desquels nous devons d'avoir reçu du Gouvernement portugais le plus bienveillant accueil, et d'avoir pu recueillir tous les renseignements épidémiologiques dont nous avions besoin pour notre travail.

II

ORIGINE ET ÉVOLUTION DE L'ÉPIDÉMIE D'OPORTO

L'enquête à laquelle nous nous sommes livrés en vue de déterminer l'origine de l'épidémie d'Oporto ne nous a pas permis de découvrir la brèche d'entrée. Le premier cas constaté par le service municipal d'hygiène remonte au 5 juin. Il s'agissait d'un Espagnol, débardeur du port, qui avait été occupé précédemment au déchargement d'une cargaison de blé venant de New-York. Cet homme habitait dans une maison de la rue Fonte-Taurina, n° 88, dans la ville basse, près du Douro (O du plan p. 872).

La même maison fournit successivement, du 5 au 30 juin, 5 cas de peste. Tous les individus atteints vivaient en commun et exerçaient la profession de portefaix, excepté l'un d'entre eux, qui était cabaretier.

Le premier malade, *Gregorio Blanco*, âgé de 47 ans, souffrait d'un point de côté droit. Il resta couché seulement pendant un jour, et fut trouvé mort dans les cabinets d'aisance. Il succomba probablement à une pneumonie pesteuse.

Deux jours après, le 7 juin, un autre Espagnol, *José Lourenço*, âgé de 33 ans, ami du précédent et demeurant dans le même quartier, escalier das Verdades, entra à l'hôpital San Antonio, porteur d'un bubon axillaire. Il avait assisté à l'enterrement de son camarade. Sa convalescence fut longue, mais il finit par se rétablir.

Les trois cas suivants se produisirent dans la maison occupée par *Gregorio Blanco*, rue Fonte-Taurina, 88. Il s'agissait encore de trois Espagnols. L'un, *José Soarez*, avait un bubon axillaire droit et un bubon inguinal gauche. Il a guéri.

Le quatrième malade, *José Souto*, pris d'un bubon inguinal droit, s'enfuit aussitôt dans son pays natal, en Galice. On sut plus tard qu'il s'était rétabli.

Le cinquième, *Alberto Rodriguez*, cabaretier, couchait dans la même chambre que *Gregorio Blanco*. Le 15 juin, il fut pris de fièvre avec prostration, et vit apparaître un bubon très douloureux à l'aine gauche, qui suppura et guérit.

Dans les maisons voisines, aux numéros 70 et 84 de la même rue Fonte-Taurina, 4 jeunes filles et une femme, qui avaient été occupées au transport ou à la réparation de sacs à grains, ne tardent pas à être infectées, du 17 juin au 14 juillet.

A la fin de juillet seulement, les cas se disséminent d'abord dans tous les bas quartiers qui avoisinent le bord du fleuve, puis dans les rues commerçantes du centre de la ville.

Lorsque nous arrivâmes à Oporto, le 2 septembre, le Bureau d'hygiène avait enregistré 64 cas et 28 décès. Dans les services d'isolement de l'hôpital San Antonio, il était entré 18 malades. Sept d'entre eux étaient morts. La mortalité pour cette période de début de l'épidémie était donc de 45,6 0/0 et à l'hôpital de 38,8 0/0, soit une mortalité moyenne de 43,7 0/0 [1].

On avait d'abord pensé que la peste avait été introduite par un navire venu de l'Inde ou de l'Egypte. Mais l'enquête montra qu'aucune provenance directe de ces pays ne pouvait être incriminée. Seul un navire anglais, le *City of Cork*, qui fait un service régulier entre Porto et Londres, avait apporté, dans les premiers jours de juin, diverses marchandises dont l'origine pouvait être suspectée : du thé de Chine, du riz de Burmah et de Rangoon,

1. *A Peste bubonica no Porto. — Rol dos casos registrados de Peste*, par le Dr Ricardo Jorge, 1899.

du tapioca de Ceylan, des fibres de jute de Calcutta, de Bombay et de l'île Maurice. Toutes ces marchandises venaient en transit de Londres, et avaient été chargées dans les docks de la Tamise.

Le *City of Cork* avait fait escale à Porto le 13 mai, le 21 mai et le 5 juin. A cette dernière relâche, qui coïncidait avec le premier cas de *Gregorio Blanco*, il n'avait débarqué que du charbon de Newcastle. Le blé au déchargement duquel avait travaillé *Gregorio Blanco* était entré dans le port à la date du 23 mai précédent, et venait de New-York.

Il ne paraît donc guère probable que le *City of Cork* puisse être incriminé.

Les renseignements que nous avons pu recueillir établissent d'autre part, que déjà, au commencement de mai, quelques cas de peste avaient été constatés au Paraguay et à Buenos-Ayres. Trois Portugais venant de Porto, débarqués à Buenos-Ayres et engagés comme chauffeurs à bord du navire *Centauro*, qui fait le service entre Buenos-Ayres et le Paraguay, furent les premiers atteints. Deux d'entre eux sont morts, et le troisième, atteint de bubons suppurés, a guéri. D'autres cas se produisirent bientôt au Paraguay. Le docteur Vogès, de l'Institut Koch, fut appelé à en faire le diagnostic.

Ceci tendrait à prouver que la peste existait déjà en Portugal au commencement du printemps, en mars ou avril, peut-être même beaucoup plus anciennement, et que les premiers cas ont très vraisemblablement passé inaperçus.

Nous pensons que la peste a dû être importée à Oporto, à une époque qu'il n'est pas possible de préciser exactement, sans doute par des rats débarqués de quelque navire venant d'Alexandrie, du golfe Persique ou de l'île Maurice, ou bien par des céréales ou autres marchandises originaires de ces pays ou de l'Inde.

A Oporto, depuis assez longtemps, paraît-il, on rencontrait des rats morts dans les ruelles de Fonte-Taurina et aux alentours. La maladie, disséminée par ces rongeurs, n'a pas tardé à se répandre parmi les rats et les souris qui abondent dans ces parages et dans les vastes docks du port. Les premiers cas de peste humaine n'ont apparu peut-être que plusieurs semaines après, et ils ont frappé tout d'abord les débardeurs et les pauvres

gens qui vivent entassés dans les maisons les plus malsaines de la ville.

Les quartiers de Fonte-Taurina et de la Douane, où l'épidémie a pris naissance, sont constitués par des masures étroites, séparées en îlots par des ruelles en escaliers tortueux, dépourvues d'égouts et de ruisseaux, où, de distance en distance, on rencontre d'immondes réceptacles de détritus de toute sorte, accumulés depuis des siècles. Le soleil ne pénètre pas dans ces ruelles, où l'on respire une odeur nauséabonde mêlée de fumée âcre. Presque toutes ces demeures misérables se composent de trois ou quatre pièces superposées, et occupées chacune par des familles entières. Parfois, le rez-de-chaussée donne asile à des animaux, porcs, chèvres, lapins, qui grouillent pêle-mêle avec les gens, dans un espace de quelques mètres de superficie.

Il est impossible de se représenter la misère de tout ce monde. Une seule chose peut surprendre, c'est que la peste n'y ait pas fait des ravages plus grands!

Nous donnons ci-après un plan de la ville de Porto, que nous devons à l'obligeance de M. le Dr Ricardo Jorge, directeur général des services d'hygiène, et qui montre la marche de l'épidémie en deux périodes, depuis le 5 juin jusqu'au 12 décembre 1899.

Tous les cas qui ont été relevés jusqu'au 24 septembre sont indiqués en points noirs, portés par une hampe. Ceux qui ont été relevés du 24 septembre au 12 décembre sont marqués en traits larges et noirs.

On peut se rendre compte, par l'examen de ce plan, de l'extension actuelle de l'épidémie, très loin de son foyer primitif qui était rue Fonte-Taurina (O sur le plan). Des cas récents se sont produits même dans les quartiers les plus élevés et les plus salubres de la ville, et dans plusieurs localités environnantes, telles que Baguim, La Foz, Mathusinos, Leça, distantes de 6 à 12 kilomètres.

III

EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES DEVANT LA COMMISSION INTERNATIONALE D'OPORTO

Jusqu'à notre arrivée à Oporto, le 3 septembre, deux malades seulement avaient été traités par le sérum antipesteux de l'Ins-



RIV.


BOMFIM
D O U R O
Gas de peste avant le 24 7bre 1899
Cas du 24. 7bre au 12 Xbre inclus

titut Pasteur. L'un était mort quelques heures après son entrée à l'hôpital. L'autre avait guéri. Ces deux malades avaient reçu chacun une seule dose de 10 c. c.

Les médecins traitants n'employaient le sérum qu'avec la plus grande circonspection et ne le croyaient guère efficace pour guérir la peste. Ils n'ignoraient pas les expériences si heureuses qui avaient été faites par Yersin à Canton et à Amoy, mais leur confiance avait été fortement ébranlée par la publication du rapport de la Commission allemande qui étudia la peste dans l'Inde en 1897. Lorsque nous proposâmes d'injecter aux malades des doses de sérum plus considérables et renouvelées quotidiennement, le Dr Nogueira, professeur de clinique médicale et chef de service, qui nous avait accueillis avec une extrême cordialité, nous laissa toute liberté d'action, mais il ne nous cacha pas le profond scepticisme dont ses confrères et lui-même étaient imbus.

Nous avons pensé aussitôt que le meilleur moyen de les convaincre était d'effectuer, devant eux, des expériences de laboratoire dont le caractère de précision pût frapper leur esprit.

Sur notre demande, une Commission internationale, composée de tous les bactériologistes portugais et étrangers alors présents à Porto, fut instituée par ordre du Président du Conseil, ministre de l'Intérieur du Portugal[1].

Le rôle de cette Commission devait consister à expérimenter sur les animaux de laboratoire les diverses méthodes actuellement connues de vaccination et de sérothérapie antipesteuses, et à rédiger un rapport qui pût ensuite éclairer les médecins et les pouvoirs publics sur les meilleurs moyens à employer pour prévenir et pour guérir la peste.

Les expériences faites par nous devant la Commission ont porté tout d'abord sur l'action préventive du sérum chez les souris, et chez les singes, dont plusieurs espèces, particulièrement les macaques, présentent une grande sensibilité à l'égard de la peste.

Nous avons montré que les souris injectées préventivement avec 0 c. c. 02 de sérum, et les singes injectés avec 2 c. c.,

1. Les membres de cette Commission étaient : MM. les docteurs Ricardo Jorge, président; Camara Pestana, Calmette, Salimbeni; Ferran, Vinas et Cusi (de Barcelone), Aaser et Geirswold (de Christiania), Hœppner (de Saint-Pétersbourg).

résistent définitivement et n'éprouvent aucun malaise apparent, lorsqu'on leur inocule, 24 ou 48 heures après le sérum, une dose de virus pesteux sûrement mortelle en 36 heures pour les souris, en moins de 5 jours pour les singes.

Nous avons employé le virus pesteux d'Oporto pour les singes : pour les souris, nous avons comparé l'action du sérum sur le virus d'Oporto et sur le virus de Djeddah apporté de l'Institut Pasteur. Le sérum était également actif sur ces deux microbes.

Nous avons fait ensuite des expériences de thérapeutique, et la Commission a pu constater officiellement dans son rapport que toutes les souris inoculées avec une dose de culture de peste d'Oporto, sûrement mortelle en 36 heures pour les souris témoins, résistent définitivement, si on leur injecte 0 c. c. 25 de sérum en une seule dose, à différents intervalles, jusqu'à 14 heures après l'infection.

L'expérimentation sur les singes, chez lesquels l'évolution clinique de la maladie présente le même aspect que l'on observe dans la forme bubonique classique chez l'homme, nous a permis de déterminer les conditions dans lesquelles on devait intervenir suivant le délai écoulé depuis le moment de l'injection et suivant la gravité des symptômes.

Voici les expériences que nous avons faites :

Macaque n° 1, témoin, reçoit sous la peau de l'avant-bras 1/25 de culture de peste sur gélose de 24 heures. Ce singe meurt le 4e jour dans la soirée.

4 autres macaques de même taille reçoivent, en même temps que le précédent, la même dose de la même culture sous la peau de l'avant-bras droit. Ils sont traités par le sérum à différents intervalles.

Macaque n° 2. — Reçoit 9 h. 1/2 après le virus 2 c. c. de sérum sous la peau du dos.

Il reçoit de nouveau, 48 heures après la précédente injection, 2 c. c. de sérum sous la peau, et, 24 heures après, 2 c. c. également sous la peau. Ce singe a parfaitement résisté. Il a présenté seulement un peu d'œdème de l'avant-bras et de l'aisselle correspondante.

Macaque n° 3. — Reçoit 24 heures après le virus 10 c. c. de sérum sous la peau. 24 heures après, on lui injecte de nouveau 10 c. c.

L'œdème de l'avant-bras est énorme. Il existe un gros bubon axillaire. L'animal est triste, abattu, il ne mange pas.

On lui injecte encore, 3 jours pleins après le virus, 10 c. c. de sérum, mais cette fois l'injection est effectuée dans la veine saphène externe, à cause de la gravité des symptômes. 24 heures après, le 4e jour plein, l'animal est

beaucoup mieux. Il mange et reprend de la gaieté. On lui injecte une dernière fois 10 c. c. de sérum sous la peau, et il se rétablit bientôt complètement.

Macaque n° 4. — Reçoit, 24 heures après le virus, 5 c. c. de sérum seulement sous la peau.

24 heures après, nouvelle dose de 5 c. c.

Le 3e jour, nouvelle dose de 5 c. c. sous la peau.

L'œdème du bras et le bubon axillaire sont énormes. En présence de la gravité des symptômes, on décide le 4e jour d'injecter 10 c. c. de sérum dans la veine saphène externe. Le lendemain, l'état général s'améliore et la convalescence s'établit sans autre intervention.

Macaque n° 5. — Reçoit, 24 heures après le virus, 5 c. c. de sérum sous la peau. On lui injecte de nouveau sous la peau 5 c. c. de sérum, le 2e, le 3e et le 4e jour. Les symptômes présentés le 3e jour ont été très graves. La convalescence a été beaucoup plus lente à s'établir que chez les singes précédents.

Ces expériences sur les macaques ont montré que, lorsque l'état symptomatique est très grave, l'intervention par le sérum est encore efficace, quand on introduit celui-ci par voie intraveineuse.

Ce fait a été pour nous un précieux enseignement, et on verra plus loin que nous en avons tiré parti dans le traitement des malades.

On pensait jusqu'à présent que la pneumonie pesteuse ne pouvait pas guérir par le sérum, quelle que soit la dose injectée. N'ayant plus de singes à notre disposition, nous avons cherché à traiter des lapins, auxquels on donne très facilement la pneumonie pesteuse, comme l'ont montré notre maître le Dr Roux et Batzaroff, en leur badigeonnant simplement les fosses nasales à l'aide d'un pinceau trempé dans une culture de bacille pesteux.

Nous avons pu constater que les lapins de petite taille (1,200 à 1,400 grammes) succombent en trois jours au plus à la pneumonie pesteuse donnée par ce procédé.

Si on leur injecte dans les veines 2 c. c. de sérum antipesteux, 16 heures après le badigeonnage des fosses nasales, ils se rétablissent parfaitement.

On pouvait donc penser que l'intervention avec le sérum par voie intraveineuse, qui guérit si bien la peste bubonique chez le singe et la peste pneumonique chez le lapin, réussirait peut-être à guérir aussi chez l'homme ces deux formes de la maladie.

Après avoir constaté ces résultats expérimentaux, la

Commission internationale s'est déclarée pleinement convaincue, et à partir de ce moment, tous les malades admis à l'hôpital des pestiférés de Bonfim ont été traités par le sérum antipesteux.

IV

ÉTUDE CLINIQUE ET ANATOMO-PATHOLOGIQUE

Pendant notre séjour à Porto, du 3 septembre au 18 novembre 1899, nous avons pu observer à l'hôpital de Bonfim 152 cas de peste.

Jusqu'au 5 septembre, les malades atteints de la peste étaient admis à l'hôpital principal (San Antonio) et isolés dans deux pavillons, disposés pour recevoir les contagieux. A partir de cette date, on les transporta hors de la ville, à Bonfim, dans un hôpital qui avait été construit lors de l'épidémie de choléra en 1884.

Cet établissement, situé sur une hauteur qui domine toute la ville, fut aménagé dans des conditions excellentes.

Les renseignements qui nous ont été obligeamment fournis par nos collègues portugais, et les observations personnelles que nous avons prises sur les malades hospitalisés, du premier au sixième jour et quelquefois davantage après le début de la maladie, nous permettent de donner ici une description succincte des formes principales qu'a présentées la peste dans le foyer épidémique d'Oporto.

Disons tout de suite que nos constatations anatomo-pathologiques et l'étude clinique attentive de nos malades montrent que, dans le plus grand nombre des cas que nous avons pu suivre, la peste évolue presque toujours d'après le type classique, c'est-à-dire avec un ou plusieurs bubons accompagnés ou non d'engorgements ganglionnaires multiples.

Les formes de *pesticémie* décrites par les médecins qui ont observé la peste dans ses foyers endémiques sont caractérisées, d'après eux, par l'absence de bubons et par la présence de microbes nombreux dans le sang.

Quand nous trouvions des microbes dans le sang, il existait en même temps des ganglions profonds, qui présentent les mêmes altérations que l'on observe dans les bubons apparents,

ou des lésions ganglionnaires et lymphatiques diffuses indiquant que le système lymphatique tout entier est atteint.

La présence des microbes dans le sang, dans de tels cas, résulte sûrement de l'infection primitive des lymphatiques. Elle peut s'observer à divers moments dans toutes les formes de peste, et elle est toujours d'un pronostic très grave, ainsi que nous aurons l'occasion de le démontrer. L'infection des lymphatiques domine donc à nos yeux toute la pathogénie de la peste, et la localisation de cette affection détermine seule le type clinique qu'elle revêt.

Dans la forme pulmonaire primitive, dont nous avons observé trois cas seulement, on trouve toujours, à côté du microbe de la peste, d'autres microbes tels que celui de l'influenza ou le diplocoque lancéolé de Talamon-Fraenkel, ou le diplobacille de Friedlander, qui ont favorisé probablement l'inflammation du poumon; cette dernière commence par les bronches et par les alvéoles. Il se produit alors une infection secondaire des appareils lymphatiques, et très souvent, après le 2e ou le 3e jour de la maladie, on observe l'apparition de bubons ou d'engorgements ganglionnaires douloureux siégeant au cou, à la fosse sus-claviculaire ou à la région sous-pectorale, ou encore beaucoup plus rarement dans les aines.

L'invasion du sang dans ces cas se fait aussi rapidement, et la mort arrive dès le 3e ou 4e jour.

La pneumonie pesteuse primitive n'est pas la seule forme de lésion pulmonaire de la peste. Nous aurons l'occasion par la suite d'étudier d'autres complications pulmonaires qu'on peut rencontrer dans toutes les autres formes graves de la maladie.

A) *Formes légères.*

Les formes légères de peste bubonique qui, on le sait, présentent une grande importance au point de vue épidémiologique, sont caractérisées par la tuméfaction inflammatoire d'un ou plusieurs ganglions appartenant au même groupe, soit à l'aine, soit à l'aisselle, soit au cou. Le paquet ganglionnaire est douloureux dès le début. Le lendemain et les deux ou trois jours suivants, la douleur et le gonflement augmentent. Le malade éprouve de la faiblesse générale, une sensation d'inquiétude ou d'angoisse, de la céphalalgie, des frissons légers. La tempé-

rature s'élève à 38° ou 38°,5, et se maintient pendant 2 ou 3 jours entre 37°,5 et 38°,5.

Le pouls est assez régulier, il donne de 85 à 90 pulsations à la minute. La langue est sèche, étalée, blanchâtre au centre, rouge à la pointe et sur les bords. Il y a de l'anorexie, des nausées, quelquefois des vomissements.

Pendant la nuit, le malade est agité, ne dort pas ou bien sommeille lourdement avec des cauchemars.

Dans la plupart des cas que nous avons observés, le ganglion d'abord petit, dur, mobile, augmente bientôt considérablement de volume, jusqu'à atteindre parfois celui d'une orange. Le tissu cellulaire environnant est infiltré. La peau est rouge et chaude sur une zone plus ou moins étendue. La douleur spontanée, d'abord lancinante, se tempère lorsque l'œdème est formé. Au bout de 5, 6 ou 7 jours, le centre du bubon se ramollit. A ce moment, la température s'élève quelquefois jusqu'à 39° ou 39°,5, et elle s'abaisse aussitôt qu'on livre passage au pus par une incision.

L'état général reste bon dans ces cas légers. La céphalalgie disparaît le 2e ou le 3e jour, souvent après une épistaxis plus ou moins abondante. Dans d'autres cas, encore plus legers, le ganglion reste petit et ne dépasse pas le volume d'une noisette ou d'une noix. La réaction du tissu cellulaire environnant est très limitée et la peau reste normale. La douleur spontanée est peu intense ; elle ne disparait que très lentement, en 10 à 12 jours, mais le ganglion reste encore pendant longtemps sensible à la pression.

Le gonflement persiste pendant un mois et davantage. En pareille circonstance, l'examen bactériologique du suc ganglionnaire, prélevé au moyen d'une ponction à la seringue, permet seul d'établir le diagnostic.

Les bubons suppurés et ouverts sont très dangereux au point de vue de la propagation de la peste dans l'entourage du malade, car le pus renferme toujours en quantité plus ou moins grande le bacille pesteux.

Parfois les microbes sont peu nombreux et englobés pour la plupart dans des leucocytes. L'examen direct sur lamelle après coloration n'en décèle pas, mais la culture permet toujours d'obtenir des colonies caractéristiques.

Nous donnons ci-après l'histoire clinique de deux malades qui ont présenté des formes légères de peste.

Observation n° 25. FAUSTINO SPASIANDO RODRIGUEZ, 21 ans.

Malade depuis le 26 septembre avec céphalalgie, nausées, prostration et faiblesse générale. Douleur et tuméfaction à la région inguinale gauche.

Le 27, la tuméfaction et la douleur augmentent. Épistaxis abondante à la suite de laquelle la céphalalgie disparaît.

Entré à l'hôpital le 29. État général satisfaisant. Facies normal. Langue un peu blanche et humide. Pouls 78, plein, régulier. Bubon inguinal gauche très empâté et douloureux à la pression. La peau qui le recouvre est rouge.

Le 30, apyrexie. État général bon. Bubon moins douloureux.

Le 6 octobre, on incise le bubon qui est devenu fluctuant. La culture du pus donne des bacilles de peste.

Observation n° 33. JOAQUINA DA CONCEPTION, 13 ans.

Malade depuis le 23 septembre avec céphalalgie, douleur et tuméfaction à la région inguinale gauche.

Pas de frissons ni de vomissements. La fillette n'a pas eu besoin de s'aliter.

Entrée à l'hôpital le 2 octobre. Langue légèrement saburrale. Bubon inguinal gauche très volumineux et très douloureux à la pression.

Pouls 104. Respiration 26.

Bubon ouvert le 3 octobre. Culture positive.

B) *Formes graves.*

Dans la très grande majorité des cas de peste que nous avons observés à Oporto, non seulement à l'hôpital, mais encore chez les individus qui sont restés à leur domicile, et à l'autopsie desquels nous avons pu assister, il s'agissait de formes graves de peste bubonique avec localisation primitive à un ou plusieurs groupes ganglionnaires.

La maladie est dans certains cas précédée de signes prodromiques tels que : sensation de faiblesse, anorexie, pesanteur à la tête, picotements douloureux et intermittents à la région où, plus tard, apparaîtra le bubon. Puis, brusquement, le sujet est pris de petits frissons dont l'intensité et la durée augmentent pendant 10, 12 ou 24 heures, et qui sont accompagnés de céphalalgie. La prostration survient aussitôt avec de l'angoisse, une soif vive, des vomissements d'abord alimentaires, puis bilieux, jaunâtres ou jaune verdâtre, quelquefois même bleuâtres comme une solution de sulfate de cuivre. Les malades ont fréquemment de la diarrhée, de la rachialgie et des douleurs vagues

dans tout le corps. Ils accusent une douleur spontanée, lancinante, très vive, à la région tuméfiée et plus ou moins volumineuse où siège le bubon.

La température monte rapidement à 39, 40° et plus. Le pouls est fréquent, plein, vibrant, souvent dicrote mais régulier. La respiration est accélérée (35, 40 à la minute). Le faciès est, en général, fortement congestionné; les yeux rouges, larmoyants, hagards, avec une expression d'angoisse et de terreur; la langue sèche, saburrale, pointillée de rouge au centre, rouge à la pointe et aux bords.

Tantôt les malades sont dans un état d'excitation angoissée, tantôt, au contraire, ils sont plongés dans une sorte de collapsus, et somnolents. En général, pendant les premières heures, ils répondent bien aux questions qu'on leur pose; il est assez rare que les troubles psychiques se manifestent dès le début. Pendant la nuit, le sommeil est agité ou bien il y a insomnie complète. Si le malade s'endort, il se réveille fréquemment en sursaut et délire ensuite pendant un moment. S'il est somnolent, il reste immobile, les yeux à demi fermés, la bouche entr'ouverte, les traits tirés, la tête un peu renversée en arrière. Il ne se plaint pas, mais sa figure exprime la souffrance. Lorsqu'on s'approche de lui, il ouvre les yeux et regarde d'un air ahuri. Il répond avec difficulté, en traînant les mots, comme un individu en état d'ivresse profonde.

Les symptômes généraux que nous venons de décrire et qu'on observe toujours avec des caractères d'intensité variables au début de la maladie, diminuent ou augmentent suivant la gravité de celle-ci, ou se modifient suivant l'intensité de l'intoxication ou de l'infection.

L'allure de la peste prend alors des formes différentes, en rapport avec les lésions organiques.

Nous pensons donc qu'il est préférable de décrire, après cet aperçu symptomatique général, les troubles fonctionnels de chaque organe et les altérations anatomo-pathologiques qui les accompagnent.

*
* *

a) Lésions ganglionnaires. — Les lésions ganglionnaires sont représentées d'une façon caractéristique par les bubons. Leur localisation détermine l'attitude spéciale du malade; ils peuvent

être uniques ou multiples. Dans la majorité des cas graves que nous avons observés, les bubons étaient multiples ou, tout au moins, en même temps qu'un bubon typique, il existait des engorgements ganglionnaires douloureux dans d'autres régions du corps.

Au point de vue anatomique, le bubon est constitué par un ou plusieurs ganglions de la même région, augmentés de volume, et par une réaction inflammatoire aiguë hémorragique du tissu cellulaire environnant, réaction qui s'étend fréquemment à la peau qui les recouvre. Celle-ci est alors rouge dans une zone plus ou moins étendue, souvent parsemée de taches noirâtres. L'épiderme se soulève quelquefois en formant des phlyctènes à contenu séreux, renfermant des microbes de la peste et d'autres microbes de la peau, tels que les staphylocoques.

L'œdème qui entoure le paquet ganglionnaire peut être plus ou moins abondant. Il présente un aspect tout à fait spécial : il est dense, fortement sanguinolent, se prend très vite en masse gélatiniforme au contact de l'air et se couvre alors de très fines gouttelettes de graisse émulsionnée, dont la formation résulte de la destruction des cellules adipeuses sous-cutanées.

Au microscope on rencontre des débris cellulaires, des blocs de substance chromatique provenant des noyaux des cellules détruites, de rares leucocytes encore conservés et de nombreux microbes pesteux libres. Quand le bubon est constitué par des ganglions multiples, ceux-ci ne présentent pas tous le même volume et sont toujours soudés les uns aux autres, laissant apercevoir leurs travées, si le ramollissement n'est pas encore complet. A la coupe, la surface de section est rouge, de couleur lie de vin, parsemée de points hémorragiques multiples, et elle laisse exsuder à la pression du scalpel un suc abondant.

On y trouve parfois des petits foyers de ramollissement diffus, ou de véritables foyers apoplectiques. Si le bubon est plus avancé, les foyers de ramollissement sont plus nombreux et finissent par se transformer en un vaste sac rempli d'un liquide épais, visqueux, de couleur chocolat, où l'on rencontre toujours des quantités formidables de bacilles pesteux.

Dans les cas de peste bubonique à évolution lente, quand la mort est le résultat de complications tardives, le contenu des

bubons est constitué exclusivement par du pus. Les microbes y sont alors beaucoup moins nombreux.

b) Lésions de la peau. — On a signalé l'existence d'une forme particulière de peste, dans laquelle la lésion primitive est représentée par une ou plusieurs pustules siégeant en un point quelconque de la surface du corps. Les médecins du moyen âge et du XVIIIe siècle l'avaient observée et indiquée comme très fréquente. Les savants allemands et autrichiens l'ont rencontrée également dans l'épidémie de peste de Bombay, mais ont, au contraire, constaté sa rareté et sa bénignité relative. Nous en avons observé un très petit nombre de cas à Oporto. L'un d'entre eux, que nous relatons, était particulièrement grave et présente un grand intérêt épidémiologique, car, au dire de notre malade, le point de départ de la lésion avait été une piqûre de punaise.

Observation. — GESUINA RITA DA SILVA, 80 ans, servante.

Malade depuis le 22 septembre.

Avait été piquée la veille par une punaise, à la main gauche.

Un œdème inflammatoire très intense était apparu aussitôt à la main et à l'avant-bras. Au siège de la piqûre, une large auréole noire s'était formée. Le centre ne tarda pas à se nécroser et la nécrose s'étendit bientot à toute la face dorsale de la main. En même temps se déclara tout le cortège symptomatique de la peste.

Le 23 septembre, la température était de 40 degrés. Il y avait du délire. Les ganglions cervicaux étaient fortement engorgés et douloureux, surtout à droite. Les ganglions inguinaux des deux côtés légèrement tuméfiés, sensibles à la pression. Traînée lymphangitique sur la cuisse droite. Ecchymose sur le dos de la main droite.

Le 24, température 38°,5. Pouls : 120. Langue et lèvre fuligineuses. Respiration fréquente. Coma.

Le 27, la malade meurt sans être sortie de l'état comateux depuis 3 jours.

Ces renseignements nous ont été fournis par le Dr Souza junior, qui a vu la malade à domicile. Nous avons assisté seulement à son autopsie, dont voici le compte rendu :

Grande ulcération nécrotique sur la face dorsale de la main gauche.

Bubon fémuro-inguinal droit ramolli, d'où sortait à l'incision un liquide de couleur chocolat très dense, visqueux.

Engorgement ganglionnaire généralisé. Pétéchies sous-pleurales surtout à la base des deux poumons. Hypostase pulmonaire intense, Pétéchies sous-péricardiques. Aucune lésion organique des orifices et des appareils valvulaires du cœur. Légère dilatation du ventricule gauche. A la base de

l'aorte, foyers nombreux d'artério-sclérose. Myocarde pâle, de consistance diminuée. Rate fortement augmentée de volume, ardoisée, friable. Appareils lymphatiques visibles à l'œil nu.

Reins. — Lésions de néphrite interstitielle chronique légères et de néphrite parenchymateuse aiguë graves.

Pétéchies sur la muqueuse des bassinets.

Foie. — Zone de nécrose et de dégénérescence graisseuse, spécialement sur la face supérieure.

Estomac. — Vide. Pétéchies sous-muqueuses très nombreuses, spécialement à la région du cardia et du pylore.

Toutes les formes cutanées ne présentent pas la gravité de celle que nous venons de décrire. La plupart de celles que nous avons observées avaient trait à des malades en même temps porteurs de bubons qui s'étaient développés 24 ou 48 heures après le début de la maladie. La lésion cutanée était toujours primitive et représentait sans aucun doute la porte d'entrée de l'infection.

Dans les formes buboniques classiques, où le bubon constitue la première manifestation, on observe aussi fréquemment des lésions de la peau telles que pétéchies, taches ecchymotiques de grandeur variable, pustules ou véritables charbons.

Les pétéchies sont surtout fréquentes; elles abondent principalement au cou, à la face, sur la poitrine et sur les parties supérieures des bras, mais on peut les rencontrer sur le reste du corps.

Nous n'avons observé de vraies pustules et des charbons que dans les formes très graves. Nous avons rencontré ces deux lésions en même temps sur le même individu.

Les pétéchies apparaissent les premières et peuvent être l'origine des pustules. La pustule débute par une vésicule entourée d'une zone enflammée, quelquefois noirâtre, à contenu séro-sanguinolent, rempli de bacilles pesteux libres.

Nous avons eu l'occasion d'assister à l'autopsie d'un sujet dont l'état avait présenté une gravité exceptionnelle, et dont le corps était complètement recouvert de pustules, de charbons et d'ecchymoses noires, rappelant l'état extérieur d'un varioleux hémorragique. Les pustules contenaient un liquide séro-sanguinolent, louche, renfermant très peu de cellules et une quantité énorme de microbes, tous libres.

Lorsque les pustules apparaissent chez des malades qui on

été traités par le sérum, nous avons observé, au contraire, que le contenu de celles-ci devenait très rapidement purulent et constitué par des amas de leucocytes bourrés de bacilles pesteux phagocytés.

D'après ce que nous avons vu, les manifestations cutanées accompagnent presque toujours les formes très graves de la peste. Elles caractérisaient le type spécial de la maladie appelée *peste noire* par les anciens auteurs.

c) *Lésions oculaires.* — Au commencement de la maladie, on observe, en général, une congestion plus ou moins intense des conjonctives. Les yeux sont larmoyants et, dans certains cas, on a affaire à une véritable conjonctivite catarrhale.

Rarement nous avons observé des ecchymoses sous-conjonctivales et un véritable chémosis.

Chez une femme atteinte de blépharite chronique, nous avons vu l'infection pesteuse déterminer des ulcérations de la cornée.

On peut aussi rencontrer des pustules conjonctivales qui produisent de petites ulcérations renfermant de nombreux microbes de la peste. Nous avons pu suivre un cas fort intéressant de lésions de l'iris représentées par des pustules sur le bord interne, avec synéchies, déformations de la pupille et hypopyon consécutif.

d) *Troubles et lésions de l'appareil digestif.* — Nous avons déjà signalé l extrême fréquence des vomissements et leur caractère au début de la maladie. La diarrhée est moins constante : elle peut se manifester après une période de constipation. Dans les cas graves, elle existe dès le début, sans coliques, et les évacuations deviennent rapidement noirâtres, muco-sanguinolentes. A l'autopsie, on trouve constamment dans la muqueuse gastrique des pétéchies peu nombreuses, petites, d'autres fois plus étendues, confluentes. Les lésions intestinales que nous avons rencontrées étaient : une congestion plus ou moins intense de la muqueuse du duodénum, s'étendant à l'intestin grêle et au gros intestin et accompagnée d'œdème sous-muqueux avec légère tuméfaction des appareils lymphatiques, follicules clos et plaques de Peyer. Les ganglions mésentériques, en général tuméfiés, présentent assez souvent, surtout lorsqu'il existe un bubon pel-

vien, la couleur lie de vin spéciale aux bubons pesteux. Leur suc renferme en abondance le microbe de la peste.

Le foie est pâle et reste ordinairement dans les limites normales. On voit constamment sur sa face supérieure des plaques de nécrose et de dégénérescence graisseuse caractéristiques. Nous n'avons pas observé les lésions de cholécystite signalées par la Commission allemande dans son rapport sur l'épidémie de Bombay.

La rate est presque toujours augmentée de volume : on peut s'en rendre compte déjà à l'examen clinique des malades. A l'autopsie, on la trouve tantôt dure, résistante, le plus souvent molle, friable. Les appareils lymphatiques sont visibles à l'œil nu et prennent parfois l'aspect de pseudo-tubercules. Sur les préparations par frottis on trouve une quantité considérable de bacilles de la peste.

e) Troubles et lésions de l'appareil uropoiétique. — La quantité d'urine émise par les malades est diminuée ou supprimée seulement dans les cas très graves. L'urine est quelquefois sanglante, toujours très acide et renferme des traces d'albumine.

A l'autopsie, nous avons constamment trouvé des lésions de néphrite parenchymateuse aiguë plus ou moins intenses, des hémorragies et quelquefois des foyers apoplectiques dans le parenchyme, spécialement entre les pyramides. Dans un cas de peste très grave, avec microbes dans le sang, qui a été traité par le sérum et qui s'est terminé par la mort 15 jours après le début du traitement, nous avons rencontré un gros rein blanc grisâtre, avec une quantité très grande de nodules, de grosseur variable jusqu'aux dimensions d'un petit pois, renfermant des microbes de la peste. Plusieurs de ces nodules étaient ramollis et constituaient de petits foyers caséeux. (Obs. 4.)

Exceptionnellement, nous avons trouvé des pétéchies sur la muqueuse de la vessie.

Nous avons pu constater aussi que les lésions anciennes des reins aggravaient considérablement, comme dans toutes les maladies infectieuses, l'évolution de la peste. (Obs. 101.)

f) Troubles et lésions de l'appareil circulatoire. — Au début de la maladie, comme nous l'avons déjà indiqué, le pouls est

plein, vibrant, dicrote, d'un rythme régulier. Plus tard et plus ou moins rapidement, suivant la gravité des cas, la tension artérielle diminue, le nombre des pulsations augmente et le pouls devient mou, dépressible, vide, filiforme et impossible à compter.

Le cœur, à l'examen clinique, présente des signes que nous croyons pouvoir rapporter à des altérations du myocarde. Ces signes sont : le prolongement du premier temps, un roulement présystolique; le deuxième temps aortique et pulmonaire renforcé, quelquefois dédoublé; bruit de galop. Ce dernier, toutes les fois que nous l'avons rencontré, coïncide avec des lésions rénales et de l'albuminurie.

Nous n'avons jamais observé de signes stéthoscopiques de lésions aiguës de l'endocarde et du péricarde.

A l'autopsie, le liquide péricardique est, en général, augmenté, teint en rouge.

Sur le péricarde viscéral, rarement sur le péricarde pariétal, on trouve des pétéchies plus ou moins nombreuses. On les rencontre plus fréquemment sur la face postérieure du cœur, le long des branches de la coronaire ou sur les oreillettes et à l'origine des grosses artères.

Quelquefois elles sont disséminées sur tout le péricarde, volumineuses, confluentes.

Nous n'avons trouvé ni endocardite, ni lésions aiguës des appareils valvulaires du cœur. Au contraire, nous avons presque constamment observé des altérations du myocarde représentées par une diminution de la consistance du muscle et par sa couleur de feuille morte.

Les modifications du sang au point de vue de la variation du nombre des leucocytes et des globules rouges ont été très bien étudiées dans les rapports des commissions allemande et autrichienne de l'Inde. Nous croyons cependant encore devoir appeler l'attention sur les altérations spéciales que le sang présente dans certaines formes caractérisées par l'invasion d'une quantité très nombreuse de microbes dans le système circulatoire. Dans ces cas, il nous semble que la mort est surtout due à une lésion profonde des globules rouges. Le sang offre alors, à l'autopsie, le même aspect que dans les septicémies produites par la bactéridie charbonneuse et le streptocoque. Il est liquide,

de couleur groseille, et on trouve dans les organes des infiltrations sanguines, dues à la diffusion de la substance chromatique des érythrocytes.

Les malades qui ont présenté au début de la maladie des phénomènes toxiques avec troubles psychiques légers meurent en général en pleine connaissance et en état d'asphyxie.

L'observation suivante précisera ces faits :

Observation. Rogerio dos Santos. 11 ans.

Entré à l'hôpital le 9 octobre dans un état très grave : délire calme, impression d'étonnement et de douleur. Bubons inguino-cruraux à gauche et à droite très douloureux. Engorgement ganglionnaire également douloureux aux deux aisselles. Pétéchies et pustules aux jambes.

Une goutte de sang ensemencée donne une quantité innombrable de colonies de peste.

Le 10, le malade a passé une nuit très agitée. Le matin, vers 4 heures, vomissements de sang noirâtre ; les vomissements ont continué, à des reprises différentes, jusqu'à 8 heures. Le facies est pâle, les traits tirés, les yeux ouverts, hagards, avec une expression de terreur vive. La peau est couverte de taches bleuâtres. Le bord des oreilles est noir. L'intelligence est assez nette : il répond aux questions qu'on lui pose. Les membres sont refroidis. Le pouls est imperceptible ; les battements du cœur sont visibles à la surface du thorax. A 10 heures du matin, coma.

Mort à 10 heures 45.

Autopsie. — Faite cinq heures après la mort. Bubon inguino-crural de chaque côté, de la grosseur d'une noix. Engorgement de tous les ganglions du corps.

Thorax. — Pétéchies sous-pleurales, pariétales et viscérales. Poumons hépatisés à la base, atélectasiés surtout à gauche dans le lobe supérieur.

Cœur. — Rien de spécial. Pétéchies sous-péricardiques.

Le sang noir, très liquide, présente une couleur jus de groseille. Il n'est pas coagulé et renferme une quantité considérable de bacilles pesteux. Les globules rouges sont déformés. Le sérum séparé des globules reste coloré en rouge vif par l'hémoglobine dissoute.

Abdomen. — Taches ecchymotiques dans le péritoine pariétal et viscéral, au niveau des reins.

Foie. — Plaques de nécrose sur la face supérieure.

Reins. — Infiltrations sanguines dans la capsule adipeuse. Néphrite parenchymateuse aiguë. Pétéchies sur la muqueuse des bassinets et le long de l'urèthre. Dans la vessie, très peu d'urine teinte en rouge.

Rate. — Légèrement augmentée de volume. Appareils lymphatiques hypertrophiés. Périsplénite chronique très limitée sur la face antérieure.

Intestins. — Pétéchies sous-muqueuses dans la dernière partie de l'intestin grêle.

Ganglions mésentériques fortement engorgés, de couleur lie de vin.

Estomac rempli d'un liquide noirâtre chocolat. La muqueuse est litté-

ralement couverte d'une multitude de pétéchies confluentes, entremêlées de petites ulcérations. — Pie mère hyperhémiée.

g) Troubles et lésions du système nerveux. — On doit faire une distinction entre les troubles occasionnés par l'intoxication qui accompagne presque toutes les formes de peste, excepté les formes très légères, et les troubles causés par la localisation directe du microbe dans les méninges ou dans la substance cérébrale.

Nous avons vu que les malades, au début, accusent toujours de la céphalalgie et des vomissements qui, très probablement, sont d'origine nerveuse. Ils accusent aussi parfois des douleurs vagues ou de la rachialgie. Les troubles psychiques qu'on observe dans la grande majorité des cas peuvent se présenter sous les formes les plus différentes. Tantôt, après une première période d'angoisse, de frayeur intense et d'excitation, le malade tombe dans un état de somnolence invincible, accompagné d'une résolution musculaire complète et d'une suppression absolue de la conscience. Il se produit parfois du nystagmus et des secousses fibrillaires des muscles. La figure, d'abord congestionnée, devient pâle, les traits sont tirés, l'expression du visage accuse une souffrance profonde. Lorsque l'état s'aggrave, le malade tombe dans un collapsus qui dure plus ou moins longtemps.

On observe, dans d'autres cas, après la somnolence, une violente excitation avec délire angoissé, ambulatoire, et des hallucinations de la vue ou de l'ouïe.

Ces hallucinations se rapportent parfois à des sensations très intenses qu'éprouvent les malades, telles que la soif. Ils croient alors voir devant eux de l'eau, des fontaines, etc.; d'autres fois ils croient être entourés d'animaux bizarres comme dans le délire alcoolique.

Le délire ambulatoire peut apparaître dès le début de la maladie. Les malades sont alors agressifs, frappent leur entourage, ou s'échappent de leur lit et courent droit devant eux jusqu'à ce que la douleur les oblige à s'arrêter.

Nous avons observé deux cas de méningite et un cas de méningo-encéphalite. Dans l'un des cas de méningite, il s'agissait d'une femme qui était entrée à l'hôpital le 7e jour de la maladie, et qui a succombé deux semaines après. Elle avait été traitée

par le sérum antipesteux. A l'autopsie, il existait, à la base, des lésions méningées représentées par un épaississement considérable de l'arachnoïde, dû à un exsudat fibrineux en voie d'organisation. Dans l'exsudat, on trouvait encore de très rares microbes de la peste, mais les cultures donnaient d'abondantes colonies (obs. 4).

Dans un autre cas, il s'agissait d'un enfant de 7 ans 1/2, entré à l'hôpital le 9 octobre, le 2e jour de sa maladie, porteur d'un bubon inguino-crural à droite, et qui présentait tous les symptômes caractéristiques de la méningite : opistothonos, strabisme, dilatation des pupilles, délire, crampes tendineuses aux bras, flexion des jambes, mouvements fibrillaires des muscles de la face, stries méningitiques de Trousseau.

Ce malade a été traité par le sérum. Le 5e jour du traitement, la température était retombée à la normale. L'état général s'est amélioré, mais les accidents méningitiques ont persisté pendant 4 jours encore après la chute de la température. Le 10e jour après l'entrée à l'hôpital, le bubon suppuré était incisé. Le malade a parfaitement guéri.

Un 3e cas, avec localisation directe du microbe dans le système nerveux, mérite d'être rapporté. Il s'agissait d'un jeune homme de 25 ans qui est entré à l'hôpital le 10 octobre, porteur d'un bubon inguinal à droite. Malade depuis la veille au soir, il présentait, au moment de son entrée, un état de délire furieux tel qu'on a été obligé de lui mettre la camisole de force.

Le lendemain, on le trouve dans le même état. Pendant la nuit, il était en proie à des hallucinations de la vue, de l'ouïe, et il croyait reconnaître dans ceux qui l'entouraient des personnes de sa connaissance. Il était très agressif et, bien que ligotté, il a mordu au bras un des infirmiers qui le soignaient.

L'excitation a duré toute la journée ; le soir il est tombé dans un état comateux et est mort à 1 heure du matin le 12 octobre.

A l'autopsie on a trouvé une méningo-encéphalite généralisée, le liquide des espaces sous-arachnoïdiens fortement trouble et rempli de microbes de la peste. La substance grise de l'écorce était très congestionnée ainsi que la substance blanche. Il y avait un léger œdème de toute la masse cérébrale.

C) *Complications pulmonaires de la peste. — Pneumonie pesteuse.*

Dans toutes les formes graves de la peste qui amènent la mort, on trouve constamment des hypostases aux bases et à la partie postérieure du poumon. En dehors de ces lésions qui sont fréquentes dans toutes les maladies infectieuses mortelles, le microbe de la peste peut se localiser dans les poumons, soit primitivement, soit au cours de l'infection, et les lésions qu'il détermine varient suivant la porte d'entrée.

Quelquefois l'infection a lieu directement par les voies respiratoires : elle peut être primitive et évoluer sans la formation d'un véritable bubon. Ou bien l'infection des poumons par les voies respiratoires peut s'établir chez un individu déjà atteint de la peste bubonique.

Nous sommes portés à admettre que, dans ces cas, l'infection doit se produire par le canal nasal, par les larmes des individus qui sont atteints de conjonctivite pesteuse, par les vomissements, et trouve le terrain préparé par l'intervention d'autres microbes, tels que celui de l'influenza, le diplocoque de Talamon-Fraenkel, etc. Elle détermine ensuite des lésions pneumoniques bien caractérisées, soit au point de vue clinique, soit au point de vue anatomo-pathologique.

Nous n'avons pas eu l'occasion d'observer, à l'hôpital, de véritables formes de pneumonie pesteuse primitive sans bubon.

Dans les cadavres que nous avons autopsiés et qui présentaient des formes de pneumonie, il existait toujours un ou plusieurs bubons.

Chez nos malades, porteurs de bubons, qui ont contracté une pneumonie pendant leur séjour à l'hôpital, et qui ont tous été traités par le sérum, les symptômes que nous avons observés étaient les suivants :

Une aggravation de l'état général, quelquefois des frissons, céphalalgie intense, respiration très accélérée, angoissée, dyspnéique ; point de coté très douloureux, toux ; crachats abondants, quelquefois muco-purulents, légèrement aérés au début, striés de sang, puis épais, rouillés, visqueux, ne renfermant pas d'air et contenant une multitude de bacilles pesteux avec quelques autres microbes.

A l'auscultation, on a tous les signes stéthoscopiques caractéristiques qui accompagnent la broncho-pneumonie.

Quand la maladie évolue vers la guérison, sous l'influence du traitement sérothérapique, on peut suivre à l'auscultation toutes les modifications des symptômes, comme dans les cas de broncho-pneumonie et de pneumonie ordinaire.

En même temps, la température diminue progressivement et non par crise.

Au point de vue anatomo-pathologique, les foyers de broncho-pneumonie pesteuse ne diffèrent pas sensiblement des autres formes de broncho-pneumonie, sauf par une réaction inflammatoire très forte du tissu pulmonaire qui se trouve directement au contact des foyers. Ces foyers sont entourés d'une zone de tissu fortement congestionné, noirâtre, plus ou moins étendu et dont le pourtour se confond graduellement avec le tissu sain. Ils ont une grande tendance au ramollissement. Leur centre est souvent déjà nécrosé et quelquefois, lorsque la maladie a évolué lentement, on peut y rencontrer de véritables cavités remplies d'un liquide épais, grisâtre, constitué par un amas de tissu nécrotique et de microbes pesteux.

L'infection pesteuse du poumon peut s'effectuer par d'autres voies que par les voies respiratoires, telles que les appareils lymphatiques des poumons et le sang.

Ces derniers modes d'infection produisent des lésions qui évoluent en général avec une grande rapidité, et qui amènent constamment la mort, si le traitement sérothérapique n'intervient pas dès le début. Nous avons toujours trouvé ces lésions caractérisées par un œdème inflammatoire aigu du poumon.

Dans ces cas, le seul signe clinique du début de la complication est exclusivement représenté par une diminution du murmure vésiculaire. Il n'y a pas de point de côté, pas de frissons, mais l'état du malade se trouve considérablement aggravé en quelques heures, et la mort arrive très rapidement.

A l'autopsie, le poumon est légèrement augmenté de volume. Sa consistance est plus grande ; il crépite très peu à la pression. A la coupe, le parenchyme pulmonaire est rouge foncé, luisant ; la pression fait sortir un liquide fortement teint en rouge, très peu aéré. Ce liquide est toujours extrêmement riche en microbes pesteux.

Sur la plèvre, on ne rencontre que rarement des lésions inflammatoires. On en trouve parfois seulement au niveau des

foyers de broncho-pneumonie périphériques. La plèvre est alors hyperhémiée et couverte d'un léger exsudat fibrineux.

Une seule fois, chez un malade mort tardivement d'une forme de broncho-pneumonie, nous avons rencontré une pleurésie étendue à la base des deux poumons, avec épanchement pleurétique sanguinolent. En général, les lésions pleurales, constantes dans les cas de peste mortels, sont représentées uniquement par des pétéchies en nombre plus ou moins considérable, localisées spécialement à la base du poumon et sur la partie postérieure.

V

SÉROTHÉRAPIE

Les expériences faites devant la Commission internationale d'Oporto, et que nous avons rapportées au début de ce mémoire, démontraient l'efficacité du sérum pour guérir les singes atteints de peste. Nous étions donc autorisés à en faire l'essai sur les hommes pestiférés. Quelles doses de sérum employer, comment les administrer? C'est ce que nous devions apprendre au lit des malades. Mais avant d'entrer dans le détail des observations, donnons d'abord l'ensemble des résultats obtenus.

C'est au mois de juin que l'on a commencé à enregistrer les cas de peste à Oporto. En juin, juillet et août, la maladie est encore peu fréquente et relativement bénigne, puis elle devient plus sévère en même temps que le nombre des pestiférés augmente. Nous avons appliqué la sérothérapie pendant la période d'état de l'épidémie, de septembre à novembre, c'est-à-dire pendant la période où les cas légers étaient le plus rares.

Du 3 septembre jusqu'au 18 novembre, 152 pestiférés sont entrés à l'hôpital de Bonfim ; 2 sont morts en arrivant, 10 n'ont pas reçu de sérum, parce qu'ils étaient en convalescence, avec leur bubon déjà en suppuration : 140 ont été traités par le sérum. Il faut y joindre 2 pestiférés traités en ville : soit en tout 142 traités dont 21 sont morts : mortalité 14,78 0/0.

Pendant le même temps, on comptait en ville 72 pestiférés, auxquels on n'a pas donné de sérum ; 46 sont morts : mortalité 63,72 0/0 [1].

1. Le cas du Dr Camara Pestana, mort de la peste à Lisbonne, est décrit à part; si on le joint aux 142 cas de Porto, nous avons pour la totalité des pestiférés traités 143 ; morts 22 ; mortalité, 15,34 0/0.

La différence entre 14,78 0/0 et 63,72 0/0 mesure donc l'efficacité du sérum.

Parmi les 21 malades qui ont succombé après avoir reçu du sérum, 3 ont séjourné moins de 12 heures à l'hôpital. Chez 3 autres, l'autopsie a montré, outre les lésions pesteuses, d'autres lésions anciennes des organes, telles que insuffisance mitrale et aortique avec sclérose et dégénérescence du myocarde, dégénérescence kystique des reins (obs. 79, 87, 101). Un 7e pestiféré (21) fut trouvé atteint de méningite tuberculeuse, un 8e cas (31) est celui d'une femme enceinte de sept mois qui, après un avortement, succomba à une infection mixte causée par le streptocoque et le bacille pesteux.

Dans la statistique, nous comparons la mortalité des malades entrés à l'hôpital, et traités par le sérum, avec celle des pestiférés restés à leur domicile et soignés par les procédés ordinaires. Ces deux catégories sont-elles comparables entre elles?

La peste à Oporto a surtout sévi sur les gens pauvres, et il n'y avait pas de différence sociale entre ceux qui étaient portés à l'hôpital et ceux qui restaient chez eux. Les personnes qui se refusaient à quitter leur logis obéissaient à cette peur de l'hôpital si fréquente dans le peuple. D'ailleurs, avant notre arrivée à Oporto, on avait constaté 64 cas de peste: 18 entrés à l'hôpital avaient donné 7 morts; 45 restés en ville avaient fourni 21 décès; c'est-à-dire, qu'à ce moment, la mortalité à l'hôpital et en ville était sensiblement comparable (39 0/0 et 46,6 0/0).

A Oporto la déclaration de la maladie était obligatoire: tous les pestiférés étaient signalés au bureau municipal et visités aussitôt par le Dr Souza (junior) qui suivait aussi les services de l'hôpital Bonfim. Ce médecin nous a obligeamment donné des renseignements sur les malades, et nous a souvent déclaré que ceux qui venaient à l'hôpital étaient aussi gravement atteints que ceux qui demeuraient chez eux.

Quelques personnes, parmi lesquelles M. le Dr Hœppner, délégué du gouvernement russe, ont prétendu que, malgré l'obligation de déclarer tous les cas de peste, un certain nombre sont restés inconnus. Ceux-ci seraient précisément les cas bénins et il en résulterait que le taux de la mortalité en ville est trop élevé. Cette assertion ne repose sur aucune donnée positive. Alors même qu'il serait démontré que quelques cas de peste bénigne

n'ont pas été enregistrés, cela ne modifierait guère les résultats. On pourrait, avec tout autant de raison, soutenir que des pneumonies pesteuses n'ont pas été reconnues, et que, de ce fait, le taux de la mortalité en ville se trouve abaissé[1]. Mais envisageons les chiffres. Du 1er au 28 octobre, période d'acmé de l'épidémie, la grande majorité des pestiférés, 90, sont traités à l'hôpital; un petit nombre, 28, restent chez eux. La mortalité des hospitalisés est de 15,5 0/0, celle des malades libres est de 53,57 0/0. Si la différence entre ces chiffres est due, comme le veut M. Hœppner, à ce que l'on n'a pas tenu compte, en ville, des cas bénins, il faudrait admettre que ces cas inconnus sont quatre fois plus nombreux que les cas déclarés, ce qui ne sera accepté par aucun de ceux qui ont observé l'épidémie d'Oporto. Chaque fois que la proportion des malades entrés à l'hôpital devient moins considérable, la mortalité générale augmente, ce qui prouve bien qu'elle dépend de l'emploi du sérum. Cela ressort avec évidence du tableau suivant :

		Cas.	Décès.	Mortalité.	Mortalité générale.
3 sept. 30 sept.	Hôpital....	28	2	7,14	33,33
	Ville......	26	16	61,57	
10 oct. 28 oct..	Hôpital....	90	14	15,5	24,57
	Ville......	28	15	53,57	
29 oct. 18 nov..	Hôpital....	24	5	20,83	40,47
	Ville......	18	12	66,66	

Pendant la première période, le nombre des pestiférés venus à l'hôpital et celui des pestiférés restés en ville est à peu près le même, mais le taux de la mortalité est très différent pour les deux catégories. Aussi, les bons résultats obtenus par le sérum étant connus dans le public, la plupart des malades se rendent à Bonfim; cette seconde période est caractérisée par un abaissement considérable de la mortalité générale, justement quand l'épidémie est le plus violente. Fin octobre, paraissent dans un journal des articles affirmant que la maladie qui sévit à Oporto n'est pas la peste. Comme on croit aisément ce que l'on désire, cette opinion est entendue, et des personnes atteintes restent chez elles. Les entrées à Bonfim diminuent, la mortalité générale

1. Cette possibilité s'appuie sur ce que, à Oporto, pendant l'épidémie de peste, les décès attribués à la tuberculose pulmonaire sont en augmentation notable sur les années précédentes, malgré la diminution de la population à la suite de l'exode provoqué par l'apparition de la peste (40,000 personnes sur 180,000 habitants).

augmente : celle-ci est en raison inverse du nombre des pestiférés traités par le sérum.

Si le lecteur veut bien se reporter au graphique n° 1 qui indique la marche de la maladie et de la mortalité, il remarquera qu'avant le 3 septembre la ligne de mortalité suit presque régulièrement celle de morbidité, tandis que l'écart entre les deux lignes devient considérable dès que le traitement sérothérapique est institué. Le graphique n° 2 lui permettra de

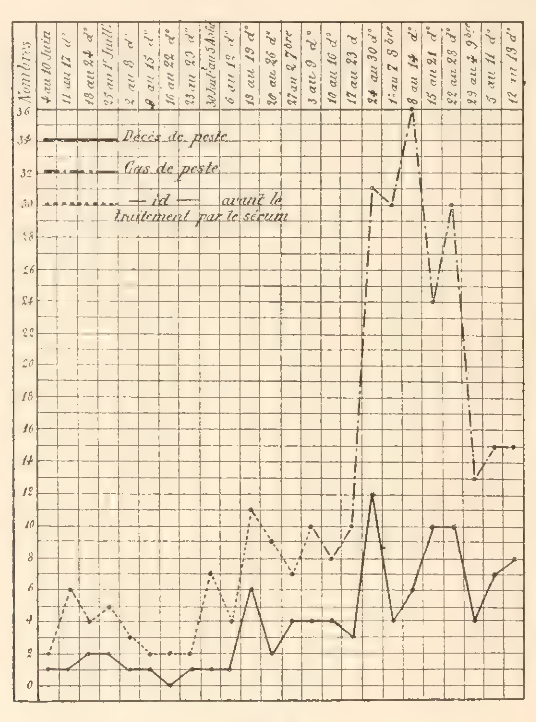
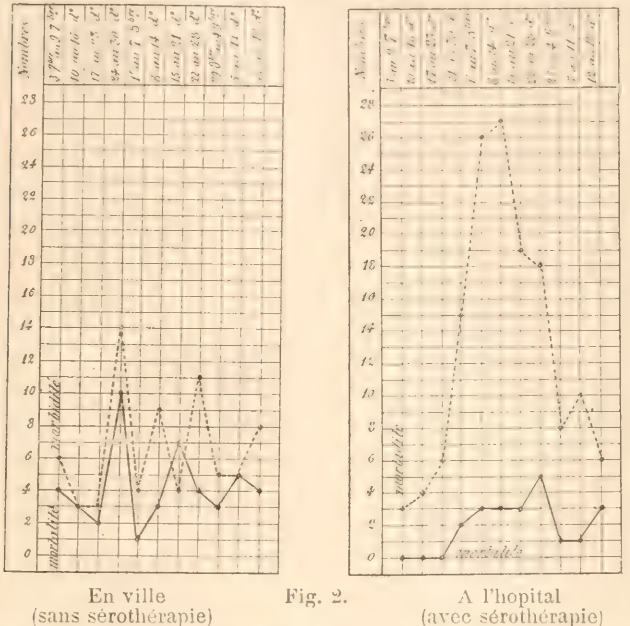


Fig. 1.

comparer les résultats du traitement sans sérum avec ceux du traitement par le sérum. Dans les premiers cas, les inflexions de la mortalité suivent celles de la morbidité ; dans le second cas l'écart entre les deux lignes est énorme, la mortalité s'élève à peine, malgré que le nombre des pestiférés s'accroisse : de sorte que, pour les cas traités, le tracé est celui d'une épidémie bénigne : il est au contraire celui d'une épidémie grave pour les non traités.

Il va sans dire que l'examen bactériologique a été fait dans presque tous les cas, et que le bacille pesteux a été isolé soit du bubon, soit du sang, soit des crachats. Les cultures obtenues se sont montrées très virulentes pour les souris, les rats, les cobayes et les singes.

L'état de quelques-uns des entrants était si grave, comme



En ville (sans sérothérapie) — Fig. 2. — A l'hopital (avec sérothérapie)

nous l'avons déjà dit, que leur sang renfermait des microbes de la peste, parfois en nombre considérable. La présence du bacille dans le sang n'implique pas fatalement la mort : elle indique cependant la gravité extrême du mal. 18 malades étaient dans ce cas : 8 sont morts. Le sang d'autres pestiférés, tout aussi fortement atteints, mais entrés pendant la nuit, n'a pas été ensemencé au moment de leur admission : le lendemain il était trop tard pour le faire, car ils avaient reçu du sérum, et nous avons constaté que les bacilles disparaissent rapidement du sang, déjà après une première injection.

Nous n'avons pas eu l'occasion de traiter des cas de pneumonie pesteuse primitive sans bubons ; mais 23 de nos malades ont présenté, au cours de leur maladie, des accidents pulmonaires avec des bacilles pesteux dans les crachats : 9 ont succombé.

⁂

L'expérience sur les animaux nous avait démontré que, pour intervenir d'un façon efficace, il fallait, dès le commencement, injecter des quantités de sérum suffisantes pour combattre l'infection, et que l'injection intraveineuse paraissait être la méthode de choix, pour obtenir une action rapide et énergique.

Les résultats des essais que nous avons pu entreprendre sur les malades ont pleinement confirmé nos vues à cet égard.

Même dans la plupart des cas de gravité moyenne, nous avons pu constater que l'amélioration qui suivait chaque injection sous-cutanée de doses faibles de sérum, 20 à 40 c. c. par exemple, ne s'affirmait pas définitivement, et que les injections successives devenaient de moins en moins efficaces. La maladie se trouve alors souvent prolongée, et on a toujours à craindre des complications secondaires.

Les doses massives dès le début se sont montrées beaucoup plus efficaces, même dans les cas très graves. La plupart des accidents mortels que nous avons observés sont survenus chez des malades qui, en raison de la gravité moyenne de leur état, au moment de leur entrée, ont été traités seulement par des petites doses. Dans ces cas, après une amélioration parfois très accentuée, au point que le traitement a été même suspendu, (obs. n°s 72-113), nous avons vu survenir brusquement, 24 ou 48 heures après, des accidents graves, surtout des complications pulmonaires qui ont souvent amené la mort. Ces accidents eussent été certainement évités si, lors de notre première intervention, nous avions injecté des doses massives sous la peau ou mieux encore, dans les veines.

C'est pourquoi, toutes les fois que nous y avons été autorisés, nous nous sommes résolus à employer systématiquement les injections intraveineuses le plus tôt possible au début de l'infection. Cette méthode, à notre avis, constitue le moyen le plus sûr et le plus rapidement efficace pour prévenir certaines lésions pulmonaires, dont nous avons parlé brièvement, et qui représentent une localisation secondaire des plus graves et des plus fréquentes, au cours des affections pesteuses, en apparence les plus bénignes.

Lorsque nous avons traité, au chapitre précédent, des complications pulmonaires de la peste, après avoir parlé de la pneu-

monie pesteuse, nous avons signalé l'existence d'une lésion spéciale du poumon, qui n'est jamais primitive, qui est difficilement et très tardivement diagnosticable au point de vue clinique, et qui, au point de vue anatomique, est constituée par un œdème inflammatoire aigu généralisé. Le suc pulmonaire renferme alors une immense quantité de bacilles pesteux.

Cette complication est extrêmement fréquente chez les individus atteints de formes graves et porteurs de bubons, soit à l'aisselle, soit au cou, ou bien aux aines, avec des engorgements ganglionnaires multiples et douloureux.

L'étude histologique de la pneumonie pesteuse chez les animaux nous a permis de constater que les formes qui évoluent avec une rapidité extrême ont comme point de départ une localisation du microbe de la peste dans les appareils lymphatiques périlobulaires.

Il s'agit alors d'une véritable *lymphangite pesteuse aiguë du poumon*. Dans ces cas, quand l'inflammation du poumon commence à se manifester, une fois la fonction des lymphatiques supprimée, l'œdème pulmonaire aigu amène à brève échéance la mort.

Nos observations nous portent à admettre que, chez l'homme, les choses ne se passent pas autrement, et nous considérons l'injection intraveineuse de sérum comme seule capable de prévenir ou de combattre cette complication, tant que la lésion des lymphatiques n'est pas trop avancée.

Nos essais de traitement, appliqués à des cas de gravité différente, peuvent être divisés en quatre groupes :

1° Malades traités par des doses moyennes de sérum répétées chaque jour, par voie sous-cutanée seule ;

2° Malades traités par des doses moyennes de sérum répétées chaque jour, par voie sous-cutanée, avec intervention intraveineuse tardive ;

3° Malades traités par des doses massives de sérum au début, par voie sous-cutanée seule ;

4° Malades traités dès le début par des doses massives de sérum sous la peau et par des injections intraveineuses.

Bien entendu, cette classification n'a pas été déterminée d'avance. Elle résulte du relevé de nos observations, car le traitement des malades a dû être réglé par les circonstances

d'après la gravité des symptômes. Nous publions en appendice un certain nombre d'observations que nous faisons suivre des enseignements qu'elles nous semblent comporter.

*
* *

De ces observations et des divers modes d'application du sérum antipesteux que nous avons expérimentés, la conclusion suivante s'impose :

Tous les malades atteints de peste bubonique ou de formes pulmonaires de peste, et surtout ces derniers, doivent être traités le plus tôt possible au début de la maladie par une injection intraveineuse de 20 c. c. de sérum antipesteux, suivie de deux injections sous-cutanées de 40 c. c. au moins chacune, répétées dans les premières 24 heures.

Nous pensons que les cas même légers en apparence, principalement s'il existe des bubons cervicaux ou axillaires, doivent être traités de cette manière, parce qu'il arrive trop souvent que ces cas se compliquent un peu plus tard de formes pulmonaires graves. Or, comme nous l'avons déjà dit, l'injection intraveineuse s'est montrée, cliniquement et expérimentalement, très efficace pour prévenir et arrêter ces complications.

Les jours suivants, tant qu'il existe de la fièvre, et même deux jours après que la température sera retombée à la normale, les malades devront recevoir quotidiennement 10, 20 ou 40 c. c. de sérum sous la peau suivant la gravité de leur état. Il ne faudra pas craindre de répéter les injections intraveineuses si cela est nécessaire.

On ne doit pas oublier, en effet, que la peste est une maladie septicémique, que les organes, les vaisseaux lymphatiques, et souvent même le sang, renferment en très grande abondance des bacilles pesteux, que l'organisme doit se débarrasser de ces bacilles par la phagocytose, et que, par suite, il est nécessaire que la toxine pesteuse soit entièrement détruite et les cellules phagocytaires assez énergiquement stimulées pour englober et digérer tous les microbes[1].

*
* *

Nous avons étudié l'action du sérum chez nos malades.

1. Quelques médecins qui assistent pour la première fois au traitement d'un pestiféré s'étonnent de voir employer de si grandes quantités de sérum. Ils sont tentés de comparer la sérothérapie de la peste à celle de la diphtérie, où l'injection d'une dose très faible de sérum suffit à guérir. Mais quelle comparaison peut-on légitimement faire entre la peste, maladie septicémique, et la diphtérie où le bacille n'envahit pas les organes et n'agit que par la toxine qu'il sécrète?

Celle-ci, comme il est à prévoir, est généralement en rapport avec la quantité injectée et avec la voie par laquelle le sérum est introduit.

Nous avons constaté d'abord que le sérum exerce une action locale des plus manifestes sur les bubons. Dans les 24 heures après l'injection, en général, les douleurs spontanées diminuent ou cessent complètement.

La réaction inflammatoire, si elle n'est pas trop avancée, se limite ou s'arrête. Si le bubon n'est apparu que depuis peu de temps, il ne suppure pas et se résorbe, quoique assez souvent avec beaucoup de lenteur. Si la suppuration s'effectue quand même, le pus est presque toujours stérile ou ne renferme que de rares microbes inclus dans des leucocytes.

Lorsque nous avons constaté la présence de microbes de la peste dans le sang des malades, on ne pouvait déjà plus en déceler par la culture 24 heures après l'injection de 40 c. c. de sérum. Et même dans les cas suivis de mort, alors qu'il avait existé des microbes dans le sang, avant le traitement par le sérum, ceux-ci avaient disparu toutes les fois qu'il s'était écoulé un temps suffisant après l'injection. A l'autopsie, le sang se montrait stérile; on ne retrouvait des microbes cultivables que dans les ganglions, dans les lésions pulmonaires et souvent dans la rate.

La température est constamment et notablement abaissée après chaque injection de sérum, même administré par voie sous-cutanée. Cet abaissement est passager dans les cas graves, parfois définitif après une seule dose massive.

Le pouls se relève, la tension artérielle augmente, et l'état général du malade s'améliore rapidement. Des sujets apportés à l'hôpital dans un état de prostration et de somnolence profonde, quelquefois dans un véritable coma, se réveillent plus ou moins vite suivant la quantité de sérum injectée et suivant la voie par laquelle il est introduit dans l'organisme. Lorsqu'il existe de l'excitation, le calme revient ; lorsqu'il y a du délire, celui-ci persiste assez fréquemment pendant un ou deux jours, même quelquefois après la chute de la température : mais il devient tranquille, raisonnant.

Les accidents sérothérapiques ne sont ni plus fréquents ni plus intenses à la suite des injections intraveineuses de sérum

qu'après les injections sous-cutanées. La quantité de sérum injectée n'a aucune influence sur ceux-ci. Quelques-uns de nos malades qui ont reçu 200 et même 300 c. c. n'ont présenté aucune éruption, tandis que d'autres qui avaient reçu des quantités beaucoup plus faibles, de 40 à 80 cent. cubes, ont éprouvé des douleurs articulaires et des érythèmes semblables à ceux qu'on observe avec tous les sérums, accompagnés parfois d'une élévation de température d'ailleurs très passagère [1].

VI

LES VACCINATIONS PRÉVENTIVES CONTRE LA PESTE

Depuis la découverte du bacille de la peste, on s'est attaché à la recherche d'une méthode pratique d'immunisation contre cette maladie. Les travaux de Roux, Yersin, Calmette et Borrel d'une part, ceux de Haffkine, d'autre part, ont établi que l'immunité peut être conférée aux animaux et à l'homme soit par le sérum antipesteux, soit par les cultures du bacille tuées par un chauffage d'une heure à 70 °.

Nous avons parlé précédemment des expériences faites par nous devant la Commission internationale d'Oporto en vue de montrer l'efficacité préventive du sérum. Leur succès nous a permis d'appliquer cette méthode de vaccination à toutes les personnes qui ont voulu s'y soumettre et qui nous ont semblé être le plus exposées à la contagion. C'est ainsi que nous avons vacciné tout le personnel des laboratoires municipaux d'hygiène et des services de désinfection ; les pompiers qui, à Porto, sont chargés, en temps d'épidémie, de transporter les cadavres au cimetière et les malades à l'hôpital; la famille de plu-

1. Les nombreuses injections intraveineuses que nous avons faites n'ont jamais produit le moindre accident. Leur technique ne présente aucune difficulté spéciale. On doit, bien entendu, prendre toutes les précautions les plus minutieuses pour ne pas injecter de bulles d'air qui pourraient amener des embolies et la mort subite. On commence par choisir une veine superficielle, facilement accessible. Celles que nous préférons sont les veines de la face antérieure du poignet, ou de la face dorsale de la main. Une compression légère de l'avant-bras les rend très apparentes, et il est alors facile d'introduire, bien parallèlement à l'axe du vaisseau, l'aiguille d'une seringue de Roux de 20 c. c. à travers la peau préalablement aseptisée.

On doit avoir soin de faire tiédir le sérum aux environs de 37° avant de charger la seringue, et on pousse l'injection lentement de manière à l'effectuer toute entière en 3 ou 4 minutes. Une gouttelette de collodion suffit ensuite à fermer la petite plaie.

sieurs malades, un certain nombre de médecins de la ville et toute la colonie française, en tout un peu plus de 600 personnes.

Nous injections à chaque sujet 5 c.c. de sérum sous la peau de l'abdomen. Jamais ces injections n'ont produit d'accident : elles ont provoqué, dans quelques cas très rares, une légère éruption d'urticaire survenant en général du 5e au 6e jour, et quelquefois même plus tôt, comme on en observe à la suite des injections de tous les sérums thérapeutiques et même du sérum de cheval normal.

On savait déjà que l'immunité conférée par les injections de sérum antipesteux est presque immédiate, mais malheureusement très fugace. Elle ne dure guère plus de 15 jours : il est donc indispensable de les renouveler toutes les deux semaines, si les sujets restent exposés à la contagion. La mort du docteur Pestana est un triste exemple de cette nécessité. Il avait reçu 5 c. c. de sérum le 18 septembre et ne s'était pas revacciné depuis cette date : l'immunité qu'il avait acquise ainsi n'existait plus à l'époque où il a contracté la peste, vers le 13 octobre suivant.

Un autre médecin, le Dr Carlos França, assistant de M. Camara Pestana, avait été vacciné le 8 octobre, avec 5 c. c. de sérum sous la peau. Le 15 du même mois, en faisant l'autopsie d'un enfant mort de lymphadénite généralisée avec très nombreux microbes dans le sang, il s'est fait une petite blessure au pouce gauche, et en retirant le cerveau du même cadavre, il s'est blessé de nouveau avec un fragment d'os au même doigt. Le 16, en retirant la moelle épinière d'un pestiféré, il se blesse encore à l'annulaire gauche.

Observation. — Pendant la nuit du 16, le Dr França éprouve une douleur lancinante, d'abord intermittente, puis continue, à la région auxillaire gauche. Les deux piqûres au pouce gauche étaient légèrement enflammées et douloureuses. Il n'y avait pas de traînées de lymphangite.

A la région auxillaire est apparu un petit ganglion du volume d'une noisette, provoquant une douleur spontanée légère qui s'exagérait beaucoup à la pression. Nuit calme, sommeil. Le 17 au matin, les mouvements du bras gauche sont rendus difficiles par la douleur ganglionnaire.

Le ganglion reste petit, la peau n'est ni infiltrée, ni rouge. Sensation de faiblesse générale, anorexie. La température était de 36°6, la langue blanche, étalée, le pouls plein, régulier, la respiration calme.

Dans la journée, sensation de chaud et froid. Céphalalgie intense, d'abord

1. Voir cette observation à l'appendice.

rétro-oculaire, puis temporale et occipitale. A midi, on lui injecte 20 c. c. de sérum sous la peau.

La température à 6 heures du soir était de 37°. Pendant la nuit, insomnie avec hallucination. Céphalalgie très forte. Sensation de sécheresse de la bouche.

Le 18, prostration, bubon très douloureux légèrement augmenté de volume. Frissons, cephalalgie, langue humide, sensations de sécheresse à la bouche.

Température le matin : 38° 8. Pouls plein, régulier, respiration calme, On lui injecte 40 c. c. de sérum sous la peau du ventre.

Pendant la nuit du 18 au 19, agitation. A minuit, température 37°,7. Etat général satisfaisant.

Le 19, aucune complication. Le bubon est moins douloureux, toujours petit. Même état général. Insomnie persistante.

Le 20, le matin, épistaxis très abondante. La céphalalgie diminue aussitôt après. Eruption d'urticaire étendue à tout le corps, sauf sur la face. Température : 38°. Faiblesse générale. Douleurs articulaires. Un peu d'appétit.

Le 21, nuit calme, sommeil. Le matin, deux épistaxis abondantes. La céphalalgie disparaît. L'éruption s'efface.

Le 22, nuit tranquille. Température 38°. Bubon douloureux seulement à la pression. L'état général s'améliore ensuite peu à peu ; la température, le 24, est tout à fait normale. La convalescence s'établit. Le ganglion reste augmenté de volume et légèrement douloureux à la pression pendant trois semaines encore après la guérison.

Le cas de peste que nous venons de rapporter eût dû être très grave en raison du mode spécial et de la multiplicité des inoculations par lesquelles le virus a été introduit dans l'organisme. Dès le début, cependant, on peut voir qu'il présentait des caractères très bénins, et ceux-ci sont certainement dus aux effets non encore épuisés de l'injection préventive. En dehors de ce cas, aucune des personnes qui étaient susceptibles par leurs fonctions de contracter la maladie, et qui ont pris soin de se faire vacciner régulièrement, n'a pris la peste.

La Commission internationale s'était proposé d'expérimenter également la valeur préventive des injections de cultures du bacille de la peste tuées par le chauffage à 70°, suivant la méthode de Haffkine, méthode qui avait d'ailleurs déjà été proposée antérieurement par M. Ferran, de Barcelone, pour le choléra. Les essais effectués d'après cette méthode à Oporto sont trop peu nombreux pour qu'on puisse en tirer aucune conclusion, surtout en ce qui concerne la durée de l'immunité. Chez les animaux, lorsqu'on injecte seulement une fois 1/2 c. c. de culture chauffée aux souris, ou 1 à 2 c. c. aux cobayes, l'im-

munité ne s'établit qu'au bout de 8 à 10 jours, et elle ne dure guère que deux semaines. Pour qu'elle se prolonge pendant plusieurs mois, il est indispensable de renouveler les injections de culture chauffée deux ou trois fois au moins, en séparant chacune d'elles par un intervalle de 12 jours.

Il semble que, chez l'homme, même après une seule injection, l'immunité soit plus solide et même plus durable, si l'on envisage les résultats que cette méthode a donnés dans l'Inde, où M. Haffkine en a généralisé l'emploi sur une très large échelle.

Cependant elle présente quelques inconvénients. D'abord, elle est parfois difficilement acceptée, parce qu'elle provoque de la fièvre pendant 24 ou 48 heures, et un peu de lymphangite autour du point d'inoculation. Ensuite, elle peut ne pas être sans dangers, lorsqu'on l'emploie en plein foyer d'épidémie : elle est susceptible de hâter et d'aggraver l'évolution de la peste chez les sujets déjà infectés et en incubation de la maladie.

Nous avons constaté en effet que lorsqu'on inocule simultanément des souris avec une culture vaccinale chauffée à 70° et avec une dose très faible de virus pesteux (cette dernière étant ordinairement insuffisante pour donner la mort), tous les animaux qui reçoivent le vaccin succombent ; au contraire, la plupart de ceux qui reçoivent seulement la dose très faible de virus pesteux survivent.

Il est donc certain que, après les injections de cultures chauffées et jusqu'à ce que l'immunité que confèrent celles-ci soit établie, c'est-à-dire pendant 8 à 10 jours après l'injection vaccinale (comme cela existe toujours à la suite des vaccinations actives par les microbes vivants ou par les toxines), l'organisme se trouve momentanément sensibilisé à l'égard d'une infection, même très légère.

En vue d'éviter les accidents qui peuvent survenir dans ces conditions, nous avons proposé, d'accord avec MM. Camara Pestana et Moraes Sarmento, de mélanger une petite quantité de sérum antipesteux aux cultures de peste tuées par la chaleur, et destinées à être employées comme vaccin. On évite ainsi très nettement, chez les singes par exemple, les phénomènes fébriles ; la réaction locale est diminuée et, d'autre part, l'immunité passive conférée immédiatement par le sérum suffit à prévenir le

danger d'une infection pesteuse déjà existante au moment de la vaccination.

Nous nous réservons de revenir, dans un prochain mémoire, sur les avantages de cette méthode et sur la durée de l'immunité qu'on est en droit d'en attendre.

VII

MESURES PROPHYLACTIQUES

Bien que la peste soit actuellement en décroissance à Oporto, il ne nous paraît pas probable que cette ville puisse se débarrasser rapidement de la maladie. Les conditions hygiéniques de plusieurs quartiers y sont tellement défectueuses qu'il n'est pas possible d'isoler convenablement les maisons contaminées.

Il faudrait que les pouvoirs publics prissent la résolution de construire immédiatement des maisons ouvrières salubres et de détruire par le feu tous les bas quartiers qui avoisinent le fleuve.

Il faudrait ensuite assainir le sous-sol de ces bas quartiers, en y installant des égoûts collecteurs, munis de réservoirs d'eau, permettant de les nettoyer fréquemment par des chasses énergiques capables d'entraîner au fleuve tous les détritus, et d'empêcher les rats d'y pulluler.

Le service de désinfection, organisé et dirigé d'une façon irréprochable, s'efforce de supprimer tous les foyers qu'on lui signale. Quelques masures de peu de valeur ont été incendiées. Les maisons auxquelles cette mesure radicale ne peut être applicable, sont nettoyées de fond en comble, arrosées de sublimé ou de créoline : les murs en briques ou en pierres sont flambés à la flamme : tous les objets stérilisables par la chaleur sont passés à l'étuve.

Malheureusement, au début de l'épidémie, de nombreux cas sont restés ignorés, parce que les malades ne faisaient pas appeler de médecin, par crainte d'être isolés ou envoyés à l'hôpital. Il n'est que trop certain, d'autre part, que beaucoup de pneumoniques pesteux échappaient à la déclaration, faute d'un diagnostic précis. Or nous savons avec quelle facilité ces malades disséminent autour d'eux les microbes de la peste !

Il faut bien avouer aussi que, pendant trop longtemps, les pouvoirs publics sont restés sourds aux objurgations des hommes

compétents qui leur indiquaient les mesures à prendre et les moyens de les appliquer.

L'existence de la peste n'a été officiellement reconnue que plus de deux mois après la constatation du premier cas. et alors que le Bureau d'hygiène avait déjà relevé 18 décès! A cette époque, la maladie se trouvait disséminée dans presque toute la ville : on ne pouvait plus songer à circonscrire le foyer principal où elle semblait avoir pris naissance.

C'est alors que le Gouvernement portugais résolut d'enserrer la ville dans un cordon sanitaire. Des troupes échelonnées sur son pourtour recevaient l'ordre d'empêcher toute sortie des habitants. Lorsque cet ordre fut donné, et avant qu'il eût été possible de le mettre à exécution. plus de 40.000 personnes s'échappèrent, sur une population totale de 180.000 âmes. C'est donc un miracle que la peste n'ait pas été transportée à ce moment dans tout le Portugal et même dans toute l'Europe!

Le cordon sanitaire faillit entraîner la famine. Les approvisionnements cessaient d'alimenter les marchés: les vivres augmentaient de prix. Les usines, les maisons de commerce avaient fermé leurs portes, jetant sur le pavé des milliers d'ouvriers sans travail.

Les médecins protestèrent longtemps contre un tel état de choses, sans que leur voix fût entendue. On se décida enfin à permettre la sortie de la ville par quelques points, où l'on organisa des postes de désinfection et une visite médicale.

Il ne semble pas que cette liberté relative ait augmenté les chances de diffusion du fléau, car déjà au moment où elle a été accordée, la peste avait traversé le cordon de troupes et s'était installée dans deux villages distants d'une douzaine de kilomètres. Elle n'a pas fait de progrès depuis.

Il ne nous paraît pas douteux que, dans un pays à population dense comme le Portugal, et surtout quand il s'agit d'une ville incapable de subsister sans l'appoint fourni par la campagne environnante, les cordons sanitaires ne peuvent être d'aucun effet utile pour empêcher la peste de se propager au dehors. Les rats, qui constituent ici le principal danger, ne sauraient être arrêtés dans leurs émigrations par de tels moyens de défense.

En Russie et dans les pays où les villages sont séparés par d'énormes espaces déserts. sans habitations ou sans cultures, il

n'en est pas de même. Les épidémies de Vetlianka et celle plus récente de Kolobovka ont, au contraire, démontré que l'isolement est alors efficace, parce que, dans de tels cas, celui-ci peut être absolu, les rongeurs indigènes se trouvant eux-mêmes dans l'impossibilité d'émigrer, faute de pouvoir rencontrer, à assez courtes distances, des gîtes d'étapes.

*
* *

L'exemple de ce qui s'est passé à Oporto et, d'autre part, l'extension menaçante de la peste depuis 1894 vers l'Europe occidentale et l'Amérique nous imposent le devoir de préciser, autant que nos connaissances actuelles nous le permettent, les mesures qu'il convient de prendre pour nous préserver de cette maladie.

Il y a d'abord toute une série de mesures préventives que chaque ville et surtout les ports de mer qui ont des relations avec les pays contaminés peuvent prendre. C'est ainsi qu'il est indispensable de prêcher partout une croisade contre les rongeurs, rats et souris. Il faut les exterminer par tous les moyens utilisables, par les « morts aux rats », par les pièges, par le virus Danysz, qui réussit dans certains cas à en détruire un grand nombre, principalement les souris, en leur communiquant une maladie infectieuse, laquelle ne s'attaque pas à d'autres espèces animales que les petits rongeurs.

Les Compagnies de navigation, les négociants importateurs de grains, de cotons bruts, de laines, de cafés, doivent faire la guerre aux rats sur leurs navires et dans leurs entrepôts. Les municipalités doivent s'efforcer de les détruire dans les égouts, dans les abattoirs, dans les halles et marchés publics. Sans doute, on ne parviendra jamais à les faire disparaître jusqu'au dernier, mais plus on diminuera leur nombre, plus on diminuera aussi les chances de propagation ou d'importation de la peste.

Les ports de mer qui reçoivent des navires et des marchandises des pays contaminés sont les plus menacés. L'application des mesures quarantenaires les plus rigoureuses ne saurait les préserver, car, alors même qu'aucun cas suspect ne se serait produit dans l'équipage ou parmi les passagers au cours de la traversée, il peut arriver que des rats et des souris, restés cachés à fond de cale, au milieu de grains, de balles de coton ou de laines, de sacs de café, etc... apportent avec eux les germes

de la maladie et la répandent dans les égouts et dans les docks où ils auront été débarqués.

Les mesures de désinfection appliquées aux marchandises elles-mêmes dans les lazarets ne peuvent être sûrement efficaces, parce que celles de ces marchandises qui abritent en général des légions de rongeurs, les cargaisons de grains par exemple ou les sacs de café, ne sauraient être soumises à l'action stérilisante de la vapeur d'eau sous pression ou de vapeurs antiseptiques quelconques.

Le seul procédé de défense qui puisse quelquefois être applicable en pareil cas consiste à décharger les grains suspects à la pelle ou à travers un tamis, dans des chalands spéciaux, comme cela a été fait récemment dans certains ports. Une surveillance étroite peut alors permettre de se rendre compte s'il existe au milieu de ces grains quelques cadavres de rongeurs et, si l'on en rencontre, il conviendra aussitôt de les faire examiner par un bactériologiste compétent. En attendant le verdict de celui-ci, on mettra l'embargo sur le chargement du navire, et on interdira à ce dernier toute communication directe avec la terre.

Si, en cours de route ou après l'arrivée au port, un cas de peste venait à se produire sur un navire, il conviendrait tout aussitôt d'isoler celui-ci de manière à ce qu'aucun de ses passagers et aucune partie de son chargement ne puissent être débarqués ailleurs que dans un lazaret insulaire. Toutes les marchandises désinfectables par la chaleur humide seront alors passées à l'étuve : celles qui ne sont pas désinfectables seront détruites par le feu. Les cales du navire, complètement vides, seront inondées pour en chasser les rats, et si l'inondation est impossible, on s'efforcera de détruire tous les rongeurs, soit par les vapeurs d'acide sulfureux humide, soit par l'acide carbonique, en prenant soin de boucher toutes les issues par lesquelles ces animaux pourraient s'échapper.

Un autre mesure préventive que toutes les villes menacées devraient prendre, est appelée à jouer un grand rôle dans la défense contre la peste : c'est l'assainissement des quartiers malpropres et des habitations ouvrières. L'expérience nous a appris, en effet, que la peste se propage d'abord dans les maisons et dans les quartiers insalubres, privés d'air et de soleil, où règnent la malpropreté et l'encombrement.

Et si, malgré toutes les précautions prises, quelques cas de peste venaient à être signalés dans une localité jusque-là indemne, les autorités sanitaires, prévenues à temps, pourront empêcher la diffusion de l'épidémie, pourvu qu'il leur soit possible d'isoler les malades, d'exercer une surveillance rigoureuse sur leur entourage, et d'empêcher qu'aucun objet souillé puisse être transporté au dehors.

Le traitement sérothérapique des malades, institué dans les conditions que nous avons établies plus haut; la désinfection rigoureuse des locaux, des linges, vêtements, objets mobiliers; enfin la vaccination immédiate et au besoin obligatoire des personnes qui ont pu être exposées à la contagion, complètent la série des mesures qui devront être prises pour éviter la propagation de la maladie.

Les moyens de défense contre la peste dont nous disposons actuellement sont sûrement capables de nous protéger efficacement contre son importation par les malades. Mais si les premiers cas observés chez l'homme apparaissaient dans une localité où les rongeurs, rats et souris, sont déjà atteints, ceux-ci auront disséminé l'agent infectieux avant qu'aucune mesure sanitaire ait pu être prise. Dans ces conditions, la peste restera, pour les habitants, une menace permanente pendant des mois, peut-être pendant des années. Tel est le cas de la ville d'Oporto.

C'est pourquoi il importe que, dès à présent, les gouvernements et les municipalités se préoccupent d'organiser, partout où il n'en existe pas encore, dans les grandes villes et les ports de commerce principalement, des services publics de désinfection et des laboratoires pourvus d'un personnel instruit, capable de renseigner les pouvoirs publics, aussitôt qu'un cas suspect viendrait à se produire. De même que l'efficacité du sérum antipesteux dans le traitement des malades dépend en grande partie de la rapidité de l'intervention, de même, en ce qui concerne la propagation de la peste, l'efficacité des mesures prises dépendra surtout de la promptitude avec laquelle elles seront appliquées.

*
* *

Qu'il nous soit permis, en terminant, d'adresser à nos maîtres, MM. Roux et Metchnikoff, l'expression de toute notre reconnaissance pour le témoignage d'estime qu'ils ont bien voulu nous donner en nous chargeant de la mission dont nous

venons de rendre compte. C'est à leurs efforts persévérants, aux idées fécondes qu'ils savent inspirer sans cesse à leurs élèves, que sont dus tous les progrès réalisés, depuis 5 ans, dans nos connaissances sur la peste et sur la sérothérapie antipesteuse.

APPENDICE

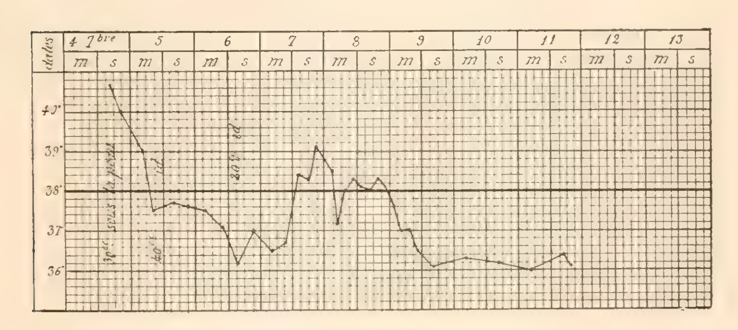
A. — Observations de malades traités par des doses moyennes de sérum répétées chaque jour, par voie sous-cutanée seule

Obs. nº 2. — Lucinda Ferreira d'Andrade, âgée de 11 ans. Entre à l'hôpital le 4 septembre, malade depuis la veille. Céphalalgie, vomissements, conjonctivite, soif intense, langue sèche saburrale; *bubon inguinal à droite*, du volume d'une noix, très douloureux. Avait eu, la veille, des frissons, un violent mal de tête et des douleurs spontanées, intenses, à la région inguinale droite.

Pouls 122, plein, régulier. Respiration 38.

Rien du côté des poumons. Foie et rate dans les limites normales.

Injection sous-cutanée de 30 c. c. de sérum au ventre.



Tracé 2.

5 *sept*. Même état. Bubon très douloureux à la pression et aux mouvements. Anorexie. Insomnie complète. Répond aux questions qu'on lui pose, mais en traînant les mots et en pleurant.

40 c. c. de sérum sous la peau du ventre.

6 *sept*. La nuit a été bonne; sommeil calme.

Facies encore un peu congestionné ; conjonctive rouge.

Bubon très douloureux à la pression; la peau qui le recouvre est rouge, infiltrée. Pouls 98.

20 c. c. de sérum.

7 *sept.* État général meilleur.

8 *sept.* Légère élévation de température, mais l'état général est satisfaisant. Bubon toujours douloureux à la pression. Peau très rouge.

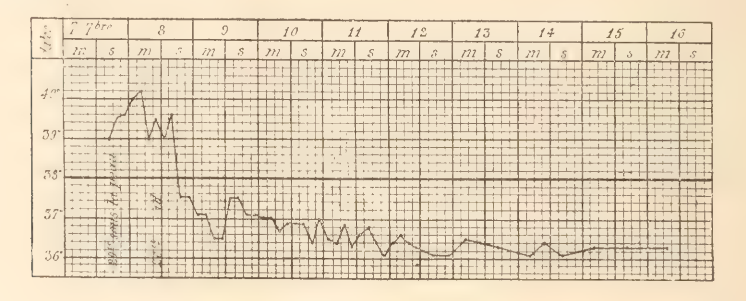
9 *sept.* Le bubon est moins douloureux. Langue presque normale l'appétit revient.

10 *sept.* Le bubon devient fluctuant.

On l'incise le 11. La convalescence s'établit. Le pus ensemencé donne très peu de colonies de peste. L'examen direct des préparations montre quelques rares microbes colorables, tous englobés dans des leucocytes.

Obs. n° 3. — Arthur Guimaraes, 9 ans. Entré à l'hôpital le 7 sept.. Demeurait en face de la maison habitée par Lucinda Ferreira d'Andrade, dans la même rue. Ces deux enfants jouaient souvent ensemble et partageaient leurs gâteaux.

Malade depuis la veille. Ganglion sus-claviculaire à droite, douloureux, infiltré. Frissons, vomissements, céphalalgie. Facies congestionné; soif intense.



Tracé 3.

Légère conjonctivite. Deux heures après son entrée, apparaît un engorgement ganglionnaire rétro-maxillaire à droite, très douloureux.

Injection de 20 c. c. de sérum sous la peau du ventre.

8 *sept.* Vomissements. Épistaxis le matin; nouvelle épistaxis le soir. Facies congestionné : 20 c. c. de sérum.

9 *sept.* Langue sèche; pouls plein; la température s'abaisse dans la soirée. L'état général s'améliore rapidement : à partir du 10, le malade entre en convalescence. Son bubon n'a pas suppuré : il s'est rèsorbé lentement, au bout de plusieurs semaines.

Obs. n° 5. — Rosa de Jésus, 14 ans, domestique. Entrée le 14 septembre, soir, malade depuis le 10 avec les symptômes habituels du début de la peste.

Bubon inguinal gauche très volumineux, infiltré, empâté, peau rouge. Délire. Prostration profonde. Conjonctivite. Yeux larmoyants.

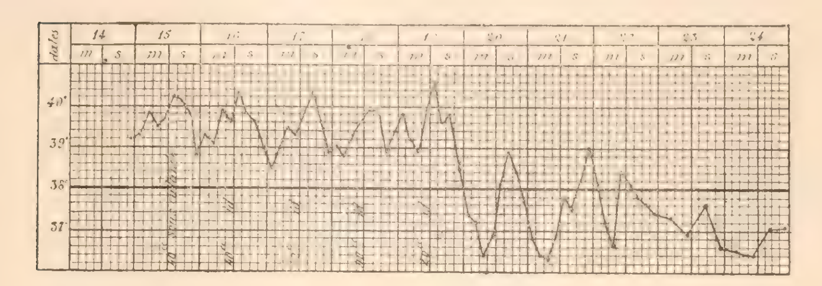
Les ganglions sous-maxillaires sont engorgés et douloureux.

Le 15, même état. Première injection de 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 16, légère amélioration de l'état général. Pétéchies nombreuses sur tout le corps. 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 17, bubon douloureux seulement à la pression. État général assez bon malgré la température qui se relève.

Nouvelle injection de sérum 40 c. c., provoquant, comme les précédentes, une nouvelle chute de température.



Tracé 5.

Le 18, 40 c. c. de sérum sous la peau. Pas de modification des symptômes généraux.

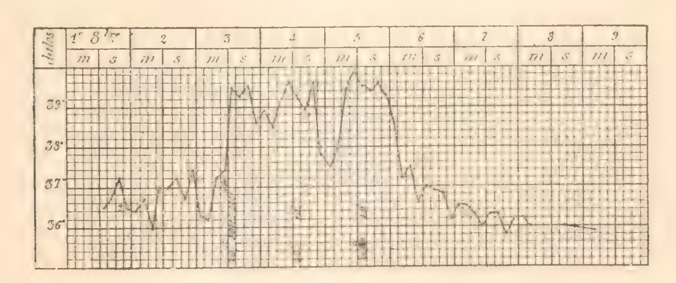
Le 19, malgré une forte élévation de température (40°,8) l'état général est beaucoup meilleur.

Le bubon est encore assez douloureux. On commence à sentir la fluctuation. Les ganglions du cou ont complètement disparu.

Dernière injection de 20 c. c. de sérum sous la peau, après laquelle la température tombe brusquement de 40°,6 à 36°,4 en l'espace de 17 heures.

La malade entre en convalescence. Le bubon est incisé le 23 sept. Le pus, largement ensemencé, donne seulement deux colonies de peste.

Obs. n° 28. — Suzanna Pereira, âgée de 5 ans. Entre à l'hôpital le 1er octobre. Petit bubon peu douloureux à la région crurale gauche.



Tracé 28.

État général bon. Pas de céphalalgie. Pas de fièvre. Nous proposons d'injecter 10 c. c. de sérum, mais le Dr Nogueira préfère attendre, trouvant le cas léger.

Le 3 au soir nous trouvons la petite fille dans un état de prostration profonde, la figure très congestionnée; les yeux rouges, larmoyants. Le bubon augmenté de volume, très douloureux; la peau rouge, infiltrée. Langue blanche, rouge à la pointe et aux bords, soif intense.

Rien du côté des poumons. Pouls 144. Resp. 42. L'enfant pousse des gémissements. On lui injecte 20 c. c. de sérum sous la peau.

4 oct. Nuit agitée. Insomnie. Le matin, prostration. Le bubon est très douloureux. Le sang de la pulpe du doigt, ensemencé, est stérile. On injecte encore 40 c. c. de sérum sous la peau.

5 oct. État général meilleur. Conjonctives encore un peu rouges. 20 c. c. de sérum sous la peau.

6 oct. L'amélioration continue. Le bubon est moins douloureux.

11 oct. Le bubon devient fluctuant. On l'ouvre le 14. Le pus ensemencé donne de rares colonies de peste. L'examen direct des préparations montre seulement quelques microbes encore colorables, tous englobés dans des leucocytes.

Obs. n° 13. — Maria Martins, 13 ans. Entrée le 5e jour de sa maladie, le 24 septembre. Bubon inguinal à droite. Bubon pelvien de la fosse iliaque droite. Douleurs abdominales très vives. Somnolence et délire. Reçoit 20 c. c.

Tracé 13.

de sérum le jour de son entrée, sous la peau, et 40 c. c. les deux jours suivants. Succombe le 27 au matin.

A l'autopsie, on constate dans la cavité péritonéale la présence de 300 à 400 grammes de liquide jaunâtre trouble. Au niveau du bubon pelvien le péritoine est hyperhémié, arborisé et desquamé. Le bubon est ramolli : il renferme un liquide dense, rouge chocolat. Il n'y avait pas de microbes pesteux dans le sang au moment de la mort. Les bubons, l'exsudat péritonéal et la rate ont donné des cultures positives.

Il existait un foyer de tuberculose au sommet gauche, des ganglions péribronchiques caséifiés et des adhérences pleurales anciennes des deux côtés.

Obs. n° 70. — Ignacio Texeira da Cunha, 16 ans, employé de commerce. Entré le 12 octobre. Malade depuis la veille. Reçoit 40 c. c. de sérum. Bubon crural à gauche, très volumineux. La température tombe le lendemain à la normale. Etat général satisfaisant le 13 et le 14.

Le 13, on lui injecte de nouveau 40 c. c. de sérum. Tout à coup, le 15, l'état s'aggrave; crachats hémoptoïques. Ganglions cervicaux très douloureux.

A l'auscultation, diminution du murmure vésiculaire dans toute l'étendue des poumons : souffle à l'angle de l'omoplate droite. Bacilles pesteux en quantité dans les crachats. Vers 4 heures du soir, pouls filiforme, respiration stertoreuse, expression de terreur. Meurt à 7 heures du soir.

A l'autopsie, œdème inflammatoire aigu des deux poumons. Sur le lobe inférieur en arrière du poumon droit, gros foyer de broncho-pneumonie. Bubon rétro-péritonéal intéressant toute la chaîne ganglionnaire depuis l'aine gauche jusqu'au pancréas. Lymphadénie généralisée.

Obs. n° 79. Emilia Candida da Silva, 57 ans, domestique, malade depuis le 11. Entre le 14 octobre à l'hôpital. Bubon inguino-crural à droite. Pouls arythmique. Reçoit 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 15, état général satisfaisant. On n'injecte pas de sérum.

Le 16, bubon crural peu douloureux. Pouls toujours arythmique. Encore 40 c. c. de sérum.

Le 17, état général beaucoup moins bon. La fièvre reprend. L'auscultation du cœur révèle des signes d'asystolie complète. On injecte 40 c. c. de sérum et de la spartéine. Meurt à une heure du matin, le 19.

A l'autopsie, lésions de peste. Foyers de bronchopneumonie à gauche, très limités. Insuffisance et sténose de la mitrale et de l'aorte. Sclérose et dégénérescence du myocarde. Néphrite interstitielle chronique et parenchymateuse aiguë. Bubons renfermant peu de microbes. Sang stérile.

Cas n° 87. — Johanna Rosa. — 60 ans. Malade depuis le 5 octobre. Grande faiblesse. Entre le 18. État général satisfaisant, température 37°,7. Anorexie. Deux gros ganglions dans l'aine droite, mobiles, sans réaction du tissu environnant, insensibles.

Elle affirme avoir ces ganglions depuis 13 ans. On pique ces ganglions et on ensemence sur gélose. On envoie la malade à la salle des convalescents.

L'état s'est subitement aggravé du 19 au 20. Les ganglions étaient durs et sont devenus très volumineux, empâtés, mais non douloureux. La sensibilité tactile est très diminuée, la sensibilité douloureuse est totalement abolie.

La sensibilité à la chaleur est conservée.

L'ensemencement effectué avec le suc ganglionnaire donne une abondante culture de peste.

Injection de 40 c. c. de sérum sous la peau.

Dans la soirée du 20, crachats rouillés. A l'auscultation, crépitation à la base du poumon gauche. 20 c. c. de sérum dans les veines. Meurt le 21 à 1 heure du matin.

A l'autopsie, hypertrophie et dilatation du ventricule gauche du cœur. Endocardite chronique et insuffisance mitrale. Aorte dilatée, avec plaques d'artério-sclérose. Sclérose et dégénérescence graisseuse du myocarde. Petits foyers de broncho-pneumonie dans le lobe inférieur du poumon gauche. Œdème des deux poumons. Lésions de peste ordinaires.

Sang du cœur stérile. Les bubons donnent le microbe pesteux pur.

*
* *

Des observations qui précèdent et de plusieurs autres que nous croyons inutile de rapporter, nous tirons les conclusions suivantes :

Si le traitement est commencé dans les deux premiers jours après le début de la maladie, et lorsqu'il s'agit de bubons uniques sans engorgement ganglionnaire généralisé, des doses relativement faibles de sérum suffisent à juguler la marche de l'infection pesteuse (*Obs. n°* 2 *et* 3).

Quand, au contraire, le traitement est institué tardivement, et lorsqu'il existe plusieurs bubons ou des engorgements ganglionnaires multiples, l'action du sérum n'est pas aussi manifeste. Les malades guérissent alors par lysis, ou bien par une crise qui s'établit plusieurs jours après le début du traitement (*Obs.* 5).

Dans les cas encore plus graves (*Obs.* 70) ou dans ceux traités plusieurs jours après le début de la maladie (*Obs.* 13), les injections de doses moyennes de sérum toutes les vingt-quatre heures déterminent des améliorations passagères qui se révèlent par un abaissement de la température et par une accalmie des phénomènes nerveux, mais l'infection n'est pas arrêtée et se se termine par la mort.

L'observation 28 montre que des sujets qui présentent une maladie d'apparence bénigne au début, avec un seul bubon et sans symptômes généraux alarmants, *doivent être traités quand même, parce que très souvent il arrive que, deux ou trois jours après l'apparition des bubons, la maladie peut prendre tout à coup une violence extrême.*

Les cas n° 79 et 87 démontrent que des affections chroniques du cœur aggravent considérablement le pronostic, et que des formes de peste, même en apparence légères au début, peuvent être mortelles malgré l'intervention sérothérapique, lorsqu'il existe des lésions des appareils valvulaires ou des altérations graves du myocarde.

B. Observations de malades traités par des doses moyennes de sérum répétées chaque jour, par voie sous-cutanée, avec intervention intraveineuse tardive.

Obs. n° 10. — Sebastiao Augusto, 14 ans.

Entré à l'hôpital le 21 septembre, le quatrième jour de sa maladie.

Céphalalgie intense. Langue sèche, très saburrale; conjonctives fortement congestionnées, larmoiement, expression de douleur et de frayeur.

Ganglions tuméfiés et très douloureux à la pression à la région axillaire droite. Du même côté, un ganglion sous-pectoral tuméfié, douloureux. Ganglions de la région inguinale et crurale, à gauche et à droite, légèrement tuméfiés et douloureux à la pression. La peau est sèche, brûlante. Pétéchies disséminées en petit nombre sur le corps.

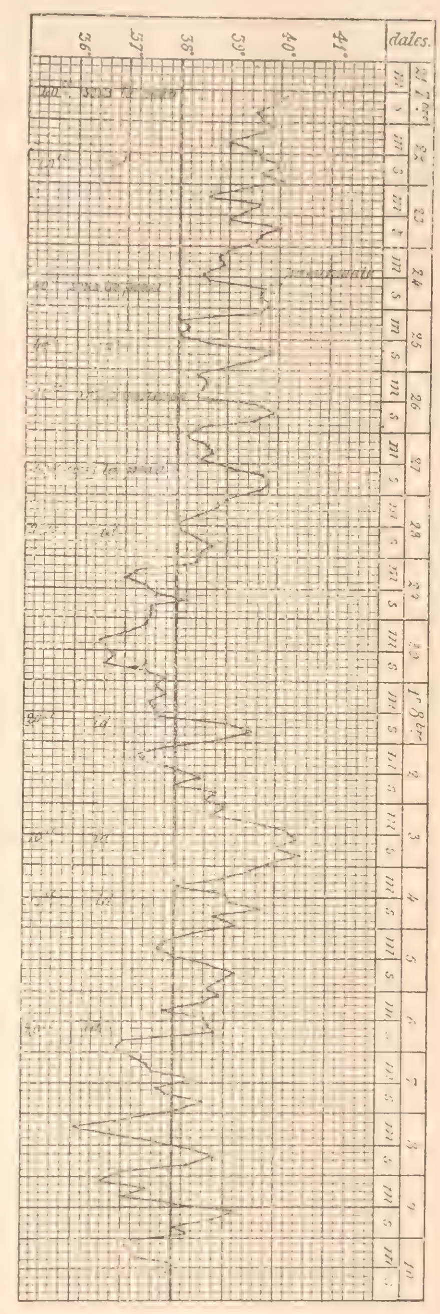
Cet enfant, malade depuis le 17, était entré ce même jour à l'hôpital San Antonio, en ville, où il était resté en observation jusqu'au 21.

Le 21, après son entrée à l'hôpital de Bonfim, on lui injecte 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 22, même état. Nouvelle injection de 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 23, état général meilleur. Pétéchies presque effacées. Ganglions moins douloureux.

Le 24, nuit mauvaise; dépression profonde. Respiration très fréquente, 56 à la minute. Douleur au côté droit du thorax. A l'auscultation on constate des râles crépitants disséminés dans le lobe supérieur du poumon droit, et un foyer d'hépatisation vers la moitié postéro-inférieure du même poumon, dans une zone de trois centimètres d'étendue. Crachats peu abondants, striés de sang. 40 c. c. de sérum sous la peau. .



Tracé 10.

Le 25. — État très grave. Pouls 112. Respiration 44. Mêmes troubles respiratoires qu'hier et, en plus, quelques râles dans le lobe inférieur. Dans le poumon gauche, râles disséminés et rares. Crachats peu abondants rouillés.

40 c. c. de sérum sous la peau.

26 *sept.* Les crachats du 24, ensemencés, ont donné des cultures de peste. État général toujours très grave. Prostration. Nuit très agitée. Crachats plus abondants, toujours mêlés de sang; quelques-uns sont composés de sang pur. Râles humides à la base des deux poumons attestant l'existence d'un peu d'œdème pulmonaire.

Injection intraveineuse de 20 c. c. de sérum.

27 *sept.* État général meilleur. Le malade parle et comprend mieux. Nuit assez bonne.

40 c. c. de sérum sous la peau.

28 *sept.* État général bon. Peu de crachats presque tous formés de sang noir (crachats d'infarctus). La broncho-pneumonie est en voie de résolution.

20 c. c. de sérum sous la peau.

29 *sept.* Épistaxis légère. Pas d'injection de sérum.

30 *sept.* au 10 *octobre.* L'amélioration continue.

Le 10 *oct.*, éruption d'urticaire généralisée. A l'auscultation on constate de nombreux râles autour de la zone où siège l'infarctus. On injecte de nouveau 20 c. c. de sérum sous la peau.

Le 3 *oct.*, nouvelle élévation de température. Quelques crachats sanguinolents. Injection de 10 c. c. de sérum sous la peau.

Le 4, encore 15 c. c. de sérum. Lésions pulmonaires limitées autour de l'infarctus.

Le 6, dernière injection de 20 c. c. de sérum. La convalescence s'établit lentement. Apyrexie complète à partir du 11 octobre. Guérison définitive.

Obs. n° 4. — Joaquina Fernandès, 36 ans, entrée le 12 septembre, le 5e jour de la maladie, avec délire, prostration, bubon inguinal à droite, engorgement ganglionnaire cervical gauche. Bubon pelvien à droite. Le sang ensemencé au moment de l'entrée donne 32 colonies de bacilles pesteux dans une goutte. Le 13, après une injection sous-cutanée de 40 c. c. de sérum, le sang ensemencé reste stérile. Le 14, apparaissent de nombreuses pétéchies sur la face, la poitrine et les membres supérieurs. Du 17 au 19, éruption pustuleuse. Les pustules renferment en abondance des bacilles pesteux phagocytés. Adynamie ataxique complète. Délire continu. Du 13 au 17, on injecte chaque jour sous la peau 40 c. c. de sérum. Le 17, la malade reçoit 40 c. c. sous la peau et 20 c. c. par voie intraveineuse, en raison de son état très grave et d'un œdème sous-cutané diffus, étendu à tout le corps, qui avait apparu en même temps que l'éruption pustuleuse, et qui devait gêner l'absorption du sérum par la peau.

A partir du 18, l'état de la malade semble s'améliorer. Le 21, on constate sur l'iris, à droite, trois points blancs comme des tubercules. Sur l'iris gauche, le 22, apparaissent deux points blancs semblables. A droite, l'iris est déformé: il s'établit des synéchies. La vision est presque abolie. On injecte de nouveau 20 c. c. de sérum sous la peau.

L'amélioration a été très passagère. A partir du 24, l'état de la malade s'aggrave. Le 26, elle tombe dans le coma et meurt le 27.

Pendant toute la maladie, après la première injection de sérum, les cultures faites avec le sang sont restées stériles.

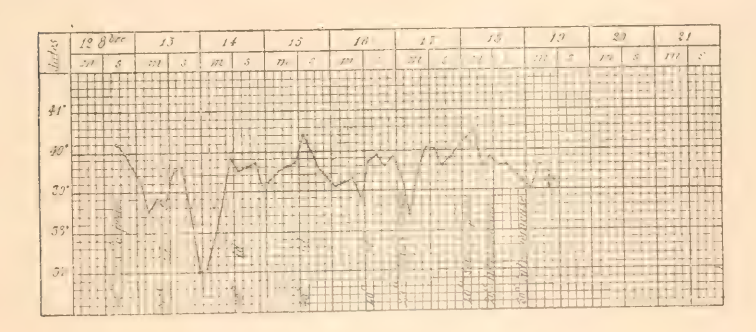
A l'autopsie, on trouve le bubon inguinal, à droite, lardacé, les bubons profonds de la fosse iliaque ramollis et renfermant un liquide épais, de couleur chocolat. A la base du cerveau, lésion de méningite avec exsudat fibrineux en voie d'organisation, renfermant des microbes de la peste en très petit nombre.

Œdème cérébral. Hypostases graves à la base des deux poumons. Reins considérablement augmentés de volume, de couleur grisâtre, parsemés d'un très grand nombre de nodules de volumes différents jusqu'à la taille d'un petit pois, en partie durs, lardacés, en partie ramollis, caséeux, et contenant des bacilles pesteux. Lésions de néphrite parenchymateuse aiguë très grave.

Le sang du cœur et la rate n'ont pas donné de cultures. On trouve des microbes seulement dans les reins, dans l'exsudat méningé et dans le bubon pelvien.

Obs. n° 72. — Americo Duarte Ferreira, 17 ans, employé de commerce. Entré à l'hôpital le 12 octobre soir.

Bubon crural à gauche. Ganglions cervicaux tuméfiés, douloureux à la pression. Langue blanche avec la pointe et les bords rouges. Lèvres sèches et desquamées. Facies congestionné. Conjonctivite légère. Pouls 119, fort,



Tracé 72.

régulier. Diminution du murmure vésiculaire à gauche et en bas.

Malade depuis le 11 avec frissons, céphalalgie, vertiges. Le 12, vomissements, douleur à l'aine gauche. 40 c. c. de sérum sous la peau, le 12 au soir, et 20 c. c. le 13, matin.

Le 14, il se croit mieux. Demande à manger.

Pouls 104, langue saburrale pointillée de rouge, douleurs axillaires et cervicales disparues. 40 c. c. sérum.

Le 15, anorexie. Pouls 112. Respiration 40, prostration profonde. Pas de délire. Douleur fugace depuis hier au côté gauche du thorax. A l'auscultation

on trouve seulement un peu de diminution du murmure vésiculaire à la base du poumon gauche.

Quelques crachats épais, non aérés, couleur d'ambre, avec stries rouge brique, renfermant des bacilles pesteux. 40 c. c. sérum.

16 *oct.* Anorexie, soif continue, diarrhée, pouls 184, respiration 36. Expectoration jus de pruneaux, prostration. Signes d'hépatisation à la base du poumon gauche. 40 c. c. sérum sous la peau.

17 *oct.* Pommettes rouges, conjonctives injectées. Pouls 110, mou, dépressible, régulier. Respiration 40. Langue sèche, fuligineuse. Parole lente, pénible.

Ganglions rétro-maxillaires douloureux. Bubon inguinal droit, indolent; murmure vésiculaire aboli à gauche et en bas. Crachats épais, rouges, peu abondants. Prostration complète le soir. Pouls faible, délire. On lui injecte 20 c. c. de sérum dans les veines.

Le 18, même état. Pouls filiforme, impossible à compter, prostration complète, délire! Respiration 54.

A 8 heures on injecte 40 c. c. de sérum sous la peau. A 9 h. 1/2, encore 20 c. c. dans les veines. Aussitôt après, la respiration devient uniforme dans toute l'étendue de la partie postérieure du poumon gauche. Elle est soufflante au niveau de l'angle inférieur de l'omoplate. Crachats abondants, non aérés, de couleur chocolat. Bubon peu tuméfié. Rate augmentée de volume. A la base du poumon droit, respiration soufflante. Diarrhée.

Le malade meurt le 19 à 11 heures du matin.

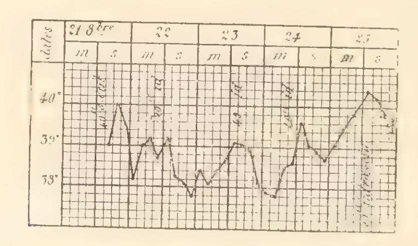
L'autopsie a montré des lésions ganglionnaires généralisées, avec bubons multiples inguino-cruraux et cervicaux. Myocardite. Broncho-pneumonie à gauche. Œdème pulmonaire *aigu* généralisé.

Sang stérile.

Rate, quelques colonies peu nombreuses.

Poumons et bubons, colonies nombreuses.

Obs. n° 98. — Manoel Beiro, 24 ans. Entre le 21 octobre, malade depuis la veille. Bubon crural à droite. Ganglions cruraux et inguinaux, à gauche,



Tracé 98.

engorgés et légèrement douloureux. État général assez bon. Expression de souffrance calme. Reçoit 40 c. c. de sérum.

Le 22, même état. 20 c. c. de sérum sous la peau.

Le 23, vomissements. État général plus déprimé. A la base du poumon

droit, diminution du murmure vésiculaire ; quelques râles crépitants. Le soir, crachats hémoptoïques. 40 c. c. de sérum sous la peau. Pouls 104.

Le 24, même état. Vomissements. Expectoration striée de sang. 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 25. Éruption papulo-vésiculeuse sur tout le corps. 20 c. c. de sérum dans les veines. Collapsus. Meurt à 1 heure du matin le 26. Culture du sang du même jour donne des colonies de peste.

A l'autopsie : Bubon inguino-crural à droite, très volumineux, se continuant dans la fosse iliaque correspondante aux ganglions rétro-péritonéaux jusqu'au pancréas. Lymphadénie généralisée à tous les ganglions du corps. Splénisation des deux poumons à la base. Œdème des lobes supérieurs. Myocarde très congestionné, brun, de consistance normale. Tuméfaction aiguë de la rate. Néphrite parenchymateuse aiguë légère.

Examen bactériologique : le sang contient peu de microbes de peste.

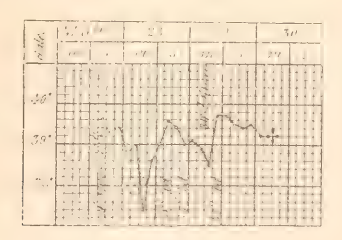
Obs. n° 113. — Jose Espasiandino Arosa. 24 ans. Entré le 27 octobre. Malade depuis le 24. Température 39°,7. Bubon crural à gauche. Reçoit 40 c. c. de sérum sous la peau. Le sang ensemencé donne de nombreuses colonies de peste.

Le 28, pouls 120, dicrote, irrégulier. Respiration sibilante aux bases. Crachats ambrés. Bubons très douloureux. Reçoit dans la journée 80 c. c. de sérum sous la peau.

Le 29 matin, épistaxis très abondante. Diarrhée. Pouls 138, dicrote. Expectoration rouillée. Souffle à l'angle de l'omoplate droite. Râles crépitants dans les deux bases. Resp. 46.

30 c. c. de sérum dans les veines et 40 c. c. sous la peau. Dans la journée se forme brusquement un gros bubon cervical à droite, très douloureux.

Les ganglions cervicaux à gauche sont engorgés, sensibles à la pression.



Tracé 113.

Le soir l'état s'aggrave. Respiration pénible.

Crachats moins abondants. Meurt le 30, à 5 heures matin.

A l'autopsie, lésions de pneumonie pesteuse aiguë au lobe inférieur et à la partie inférieure des lobes supérieurs, 1er stade, hépatisation rouge. Le reste du parenchyme légèrement congestionné, œdématié.

Lymphadénie généralisée. Lésions ordinaires des autres organes.

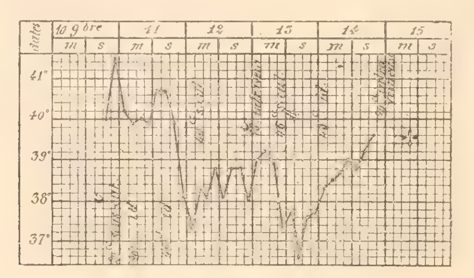
Cultures positives du sang, de la rate, des poumons et des bubons.

Observation du Dr Camara Pestana.

Le 7 novembre, le Dr Camara Pestana fait à l'hôpital de Bonfim, à Porto, l'autopsie d'un cas de pneumonie pesteuse, ayant au médius gauche une petite écorchure auprès de l'ongle, à laquelle il ne prête pas attention. Le 9, il rentre à Lisbonne dans la soirée.

Le 10 dans la matinée, il éprouve une sensation de picotements douloureux à l'aisselle gauche. L'état général était bon à ce moment. Vers 5 heures de l'après-midi, il est pris de petits frissons qui augmentent rapidement d'intensité en quelques heures; à 9 heures du soir, température 40° : à minuit, 41°.5.

Céphalalgie intense, vomissements, diarrhée, anurie. Bubon axillaire



Tracé Camara Pestana.

gauche très douloureux, de la dimension d'un œuf de pigeon. On le conduit à l'hôpital dos Arroyos, et à minuit il reçoit une première injection sous-cutanée de 20 c. c. de sérum.

La température tombe à 6 heures du matin à 39°,9. Il reçoit encore une injection sous-cutanée de 20 c. c. de sérum.

Dans la journée encore céphalalgie intense, vomissements, diarrhée et douleurs spontanées très vives au bubon; anurie, soif intense. Pas de troubles psychiques. Pouls fréquent, 108, plein, régulier; respiration calme.

A 6 heures du soir, nouvelle élévation de la température : 40°,7; nouvelle injection de 40 c. c. de sérum sous la peau, suivie d'un bain tiède dans lequel le malade urine pour la première fois depuis le début de la maladie. La température tombe rapidement jusqu'à 37°,3 à 3 heures du matin. Les vomissements, de couleur bleu de ciel comme une solution de sulfate de cuivre, avaient persisté pendant la nuit, accompagnés de nausées continues; la céphalalgie avait presque disparu.

A ce moment l'un de nous, appelé de Porto par le malade, arrive auprès de lui et, malgré l'amélioration actuelle, en raison de la gravité des symptômes du début et de la contamination directe résultant d'une plaie anatomique, insiste pour lui faire accepter l'injection intraveineuse de sérum, méthode qui, entre les mains du Dr Camara Pestana lui-même, avait donné des résultats si brillants qu'il en était enthousiaste.

Le malade refuse catégoriquement cette intervention, se croyant déjà en voie de guérison; il consent seulement le matin, à 6 heures, à se laisser injecter 40 c. c. de sérum sous la peau, parce que la température tend à s'élever.

Dans la journée du 12, les douleurs violentes, spontanées, au bubon, accompagnées d'un engorgement ganglionnaire également douloureux à la fosse sous-claviculaire gauche, de nausées, de diarrhée et d'un peu de céphalalgie, jettent le malade dans un état d'angoisse et d'excitation inquiète. A 2 heures du matin, le 13, pouls 132, faible, dépressible. Respiration 38; diminution du murmure vésiculaire à la base du poumon gauche.

Le malade, voyant alors les symptômes s'aggraver, se décide à se laisser injecter pour la première fois 15 c. c. de sérum dans les veines et 45 c. c. sous la peau.

Dix minutes après, le calme revient, et, une demi-heure après, le malade s'endort pour la première fois depuis le début de sa maladie. La température tombe à 36°,6 à 6 heures du soir.

Nuit du 13 au 14 relativement calme; à 3 heures du matin, nouvelle élévation de la température. On injecte de nouveau 40 c. c. de sérum sous la peau, mais la température ne s'abaisse plus cette fois.

Dans la journée du 14 il se forme un œdème énorme aux bubons axillaire et sus-claviculaire, sans rougeur à la peau, donnant la sensation de fausse fluctuation. La respiration devient difficile, fréquente, superficielle. Pas de troubles psychiques, mais prostration profonde. A 9 heures du soir, toux légère. Le malade émet un crachat hémoptoïque. A ce moment la diminution du murmure vésiculaire était étendue à tout le poumon. Le pouls petit, dépressible, 124. La diarrhée continuait toujours, muco-sanguinolente. Une dernière injection intraveineuse de 20 c. c. de sérum ne donne aucun résultat, et le malade meurt à 11 heures du matin le 15, avec tous les signes caractéristiques d'un œdème pulmonaire aigu, ayant conservé sa pleine connaissance jusqu'à une heure avant la mort.

L'autopsie n'a pas été faite.

*
* *

Ces observations confirment tout d'abord les remarques que nous avons faites précédemment au sujet de l'insuffisance des doses moyennes. Elles démontrent en même temps l'inefficacité habituelle des injections intraveineuses employées tardivement, surtout lorsque des symptômes d'infection pulmonaire grave se sont déjà manifestés.

Un seul des cas que nous avons rapportés ci-dessus s'est terminé par la guérison. (*Obs.* 10.)

Elles démontrent aussi, comme nous l'avons déjà signalé, la fréquence des complications pulmonaires graves, souvent tardives, chez les malades porteurs de bubons aux aisselles ou au cou. Ce fait est vraisemblablement une conséquence des relations étroites entre les appareils lymphatiques du cou et des aisselles, et les systèmes lymphatiques pulmonaires. (*Cas nos* 72, 98, 113 *et Dr Camara Pestana.*)

En ce qui concerne le cas particulier du Dr Camara Pestana, qui constitue encore une regrettable confirmation de ce que nous venons d'exposer, nous devons dire que notre malheureux collègue croyait avoir éprouvé une légère atteinte de peste à Porto le 18 septembre, époque à laquelle il s'était injecté, à titre préventif, 6 c. c. de sérum sous la peau, parce qu'il avait un ganglion cervical sous-maxillaire légèrement engorgé et sensible à la pression.

L'injection de sérum ayant amené, 7 jours après, une éruption d'urticaire avec douleurs articulaires et léger engorgement ganglionnaire inguinal du côté de l'injection, le Dr Camara Pestana, toujours persuadé qu'il se trouvait bien vacciné par une attaque légère de peste conjurée par le sérum, ne prit pas soin de se faire revacciner ensuite tous les 15 jours.

L'exemple du Dr Carlos França, son assistant, dont nous avons rapporté l'histoire, qui, étant vacciné par le sérum, n'avait eu, malgré plusieurs inoculations anatomiques graves, que des accidents de peste très atténués (lesquels ont très facilement cédé à de petites doses de sérum), avait persuadé au Dr Camara Pestana qu'il ne pourrait avoir, lui aussi, qu'une atteinte très légère.

C'est à cause de cette conviction qu'il opposa à ses assistants d'abord, et à l'un de nous ensuite, un refus absolu, lorsqu'on lui conseilla de se laisser injecter par voie intraveineuse, alors qu'il en était encore temps.

SÉRIE C. — OBSERVATIONS DE MALADES TRAITÉS PAR DES DOSES MASSIVES DE SÉRUM, AU DÉBUT, PAR VOIE SOUS-CUTANÉE SEULE.

Obs. n° 55. — GERTRUDE DA SILVA, 20 ans. Nourrice. Malade depuis le 7 octobre au matin, avec frissons, céphalalgie; pas de vomissements, pas de diarrhée. Prostration profonde, vertiges.

Entre à Bonfim le 8 au soir, dans un état de prostration complète, sans connaissance. Facies congestionné. Yeux larmoyants, rouges. Langue saburrale, sèche. Bubon axillaire droit.

On lui injecte 40 c. c. de sérum sous la peau.

9 *oct.* Même état. Encore 40 c. c. de sérum sous la peau le matin et 40 c. c. le soir.

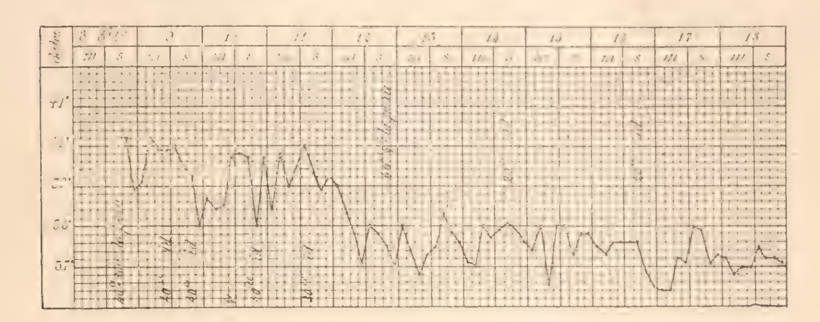
10 *oct.* État général, meilleur. Elle commence à comprendre et à parler quoique avec peine. Diarrhée. Rien aux poumons. Epistaxis le soir.

11 *oct.* Nuit bonne. Le bubon est très douloureux.

12 *oct.* État général meilleur. Le lait ensemencé n'a pas donné de cultures

de peste. Une goutte de sang ensemencé le 9 a donné 9 colonies du bacille pesteux.

13 *oct.* Amélioration considérable. L'embarras de la parole a disparu. Le bubon est moins douloureux.



Tracé 55.

14 *oct.* Grande faiblesse. Le bubon n'est presque plus sensible à la pression. L'appétit revient.

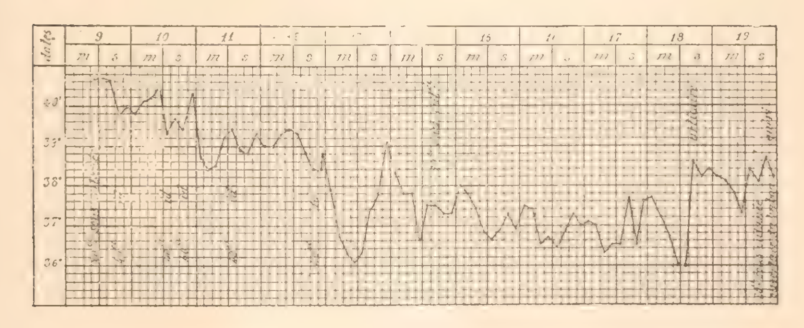
Un peu de conjonctivite catarrhale à droite.

La convalescence s'établit.

*Obs. n*o 58. — Alberto de Faria Ferreira. 7 ans et demi, fils d'un portefaix. Malade depuis le 7 octobre avec céphalalgie, vomissements, délire. Température, 40o,7. Pouls 140. Respiration 40.

Entré à l'hôpital le 9. État général très grave. Impossible de recueillir son histoire. Bubon inguinal droit. Facies congestionné; conjonctivite. Opisthotonos. Strabisme léger; pupilles dilatées, réaction pupillaire lente. Pouls 135. Respiration 44.

20 c. c. de sérum le matin; 40 c. c. le soir.



Tracé 58.

10 *oct.* Même état. Pétéchies, pustules et taches hémorrhagiques surtout aux jambes. Opisthotonos, strabisme. Réflexes pupillaires abolis.

Crampes tendineuses, flexion des jambes, stries méningitiques de Trousseau. Pouls 114; respiration 26. On injecte 40 c. c. de sérum sous la peau.

11 *oct.* Nuit très agitée. Tous les symptômes de la veille persistent. Agitation et carphologie. 40 c. c. de sérum.

12 *oct.* Un peu de sommeil calme. Langue fuligineuse, lèvres sèches, desquamées, noires. Moins de strabisme; les symptômes de méningisme diminuent. Pétéchies effacées; pustules sèches. 40 c. c. de sérum.

13 *oct.* Température normale. État général meilleur. Les autres phénomènes restent stationnaires. Calme; indifférence.

15 *oct.* Le bubon n'est plus douloureux même à la pression. L'état général s'améliore peu à peu, mais les phénomènes de méningisme ne disparaissent complètement que le 18.

Le 19, on ouvre le bubon. Le 23, le malade est en pleine convalescence.

Le pus du bubon a donné des cultures abondantes de bacille pesteux.

*
* *

Dans les cas graves, lorsqu'il existe un seul bubon, sans engorgement ganglionnaire généralisé, les injections de doses massives de sérum sous la peau, tout au début de la maladie, agissent d'une façon très efficace; mais il est alors nécessaire d'injecter 100 à 120 c. c. de sérum dans les premières vingt-quatre heures. (*Obs.* 55 *et* 58.)

Nous n'avons pas de cas mortels dans cette série, parce que, au cours du traitement, lorsque nous avons eu affaire à des cas très graves, qui nous paraissaient traîner en longueur, nous avons résolu de pratiquer des injections intraveineuses à nos malades. Dès lors ces derniers ont été classés dans la série précédente (B).

SÉRIE D. — MALADES TRAITÉS DÈS LE DÉBUT PAR DES DOSES MASSIVES DE SÉRUM SOUS LA PEAU ET PAR DES INJECTIONS INTRAVEINEUSES.

Obs. nº 11. — ANDRÉ-TUNAS GARCIA, garçon de pharmacie, 24 ans, Espagnol.

Entré le 22 septembre. Était indisposé depuis deux ou trois jours et éprouvait une douleur vague à la région crurale droite. Pendant la nuit du 21 au 22, il est pris de frissons violents avec céphalalgie, vomissements, diarrhée.

Bubon crural droit très douloureux, surtout à la pression. Ganglions de l'aine un peu tuméfiés et douloureux. Le bubon a le volume d'une petite pomme. La peau qui le recouvre est rouge, infiltrée.

Injection sous-cutanée de 40 c. c. de sérum.

23 *sept.* État extrêmement grave. Facies très congestionné, conjonctives rouges, larmoiement. Le malade peut à peine prononcer quelques mots incohérents.

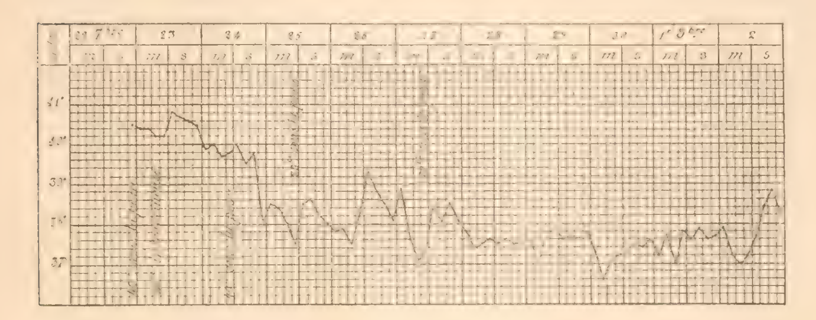
Prostration entremêlée de périodes d'agitation pendant lesquelles il cherche à s'échapper. Démarche chancelante comme celle d'un homme en état d'ivresse.

Injection intraveineuse de 20 c. c. de sérum. Pouls 134. Respiration 52.

24 *sept.* Nuit très agitée. Délire : plus calme le matin. Grande dépression. 40 c. c. de sérum sous la peau.

25 *sept.* Bubon dans le même état. Délire ambulatoire pendant la nuit. Le matin, le malade reprend connaissance. La culture du sang faite le 23 n'a rien donné.

Injection sous-cutanée de 20 c. c. de sérum.



Tracé 11.

26 *sept.* Amélioration de l'état général. Somnolence. Parole difficile.

27 *sept.* Le bubon tend à suppurer; moins douloureux.

3 *octobre.* Le bubon est ramolli. Le 4, on injecte 10 c. c. de sérum.

Le pus ne donne que très peu de colonies de peste. Convalescence régulière.

Obs. n° 106. — Luiz-Carlos Texeira, 14 ans. Entré le 22 octobre avec douleur à l'aine gauche, douleurs vagues dans tout le corps, rachialgie, vomissements, frissons, insomnie. Soif intense, diarrhée, anorexie. Facies bouffi, congestionné, conjonctives rouges. Langue blanche, pointillée de rouge au centre, rouge aux bords et à la pointe. Bubon crural gauche gros comme un œuf de poule, douloureux, empâté. Peau infiltrée, rouge. Ganglions inguinaux engorgés, pas douloureux. Petits ganglions axillaires sensibles à la pression.

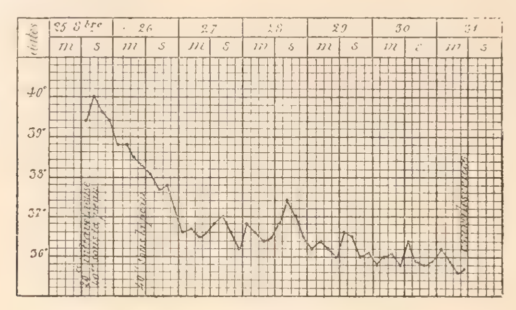
Au tiers inférieur de la face antérieure de la jambe gauche, pustule violacée entourée d'une zone inflammatoire, laissant écouler à la pression un liquide séreux, jaunâtre. La pustule est apparue le 22. Dans la maison de commerce de mercerie où il travaillait, il y avait beaucoup de rats; on en avait trouvé un mort la semaine précédente.

Cœur un peu hypertrophié. Rien aux poumons.

Rate légèrement augmentée de volume. On injecte 20 c. c. de sérum dans les veines et 40 c. c. sous la peau.

Le 26, légère amélioration. 40 c. c. de sérum sous la peau.

27 *oct.* Le malade se lève. Légère céphalalgie. Langue saburrale. Bubon moins douloureux. Respiration normale. Pouls 96, mou et arythmique, mais sans intermittences.



Tracé 106.

28 *oct.* Sensation de faiblesse. Diarrhée. Appétit. Bubon moins infiltré et moins douloureux.

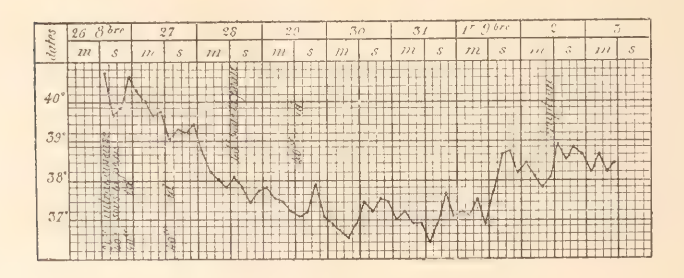
29 *oct.* Le bubon devient fluctuant. État général bon.

1er *nov.* Le bubon est incisé. Convalescence.

Obs. n° 110. — MANOEL PINTO ALVES, 14 ans. Entré à l'hôpital le 26 octobre, dans un état de délirec omplet; on a trouvé, paraît-il, beaucoup de rats morts dans la maison qu'il habitait.

Prostration, facies congestionné, conjonctives rouges, éruption papulo-vésiculeuse sur la figure. Bubon axillaire gauche volumineux. Les ganglions des deux aines sont tuméfiés, et, du côté droit, sensibles à la pression. Douleur à la fosse iliaque droite. Rate augmentée de volume. Foie un peu douloureux à la pression.

Pustule de la taille d'une pièce de 20 centimes au doigt médius de la



Tracé 110.

main gauche, à la face interne de la première phalange.

Cœur : Premier temps à la pointe très prolongé, presque musical; premier temps aortique très rude, un peu ronflant, 2e temps dédoublé. Pouls 102, mou, dépressible.

Rien aux poumons.

On injecte 40 c. c. de sérum sous la peau, 20 c. c. dans les veines,

Le 27, l'état mental s'est amélioré. On peut recueillir son histoire. Était malade depuis le 23 avec frissons, céphalagie, douleurs axillaires, insomnie. A perdu connaissance dans la nuit du 24 au 25 et se réveille à l'hôpital.

Bubon axillaire toujours dur et douloureux. Pouls 112. Langue saburrale, yeux injectés, agitation et énervement. Émet un crachat hémoptoïque.

Le 28, sommeil calme. État général meilleur. Bubon moins tuméfié, mais encore douloureux. Pouls mou, dépressible.

Le 29, langue presque nettoyée. Pouls 52, faible, un peu onduleux. Persistance des signes cardiaques. Bubon moins infiltré, mais encore volumineux et douloureux.

Le 30, état général meilleur. Appétit. Pouls 50, faible, ondulé. Émet encore un crachat hémoptoïque. Rien à l'auscultation des poumons.

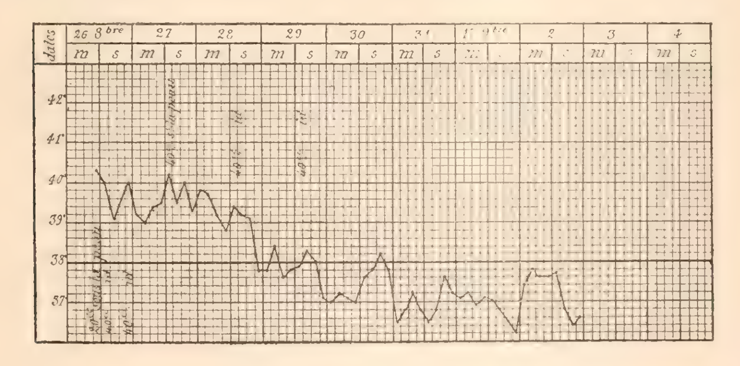
Le 31, expectoration muco-purulente peu abondante, et un crachat strié de sang. Pouls 66, petit, dépressible, bubon très dur et sensible.

1er *nov*. Même état.

2 *nov*. Éruption d'urticaire sur le ventre.

3 *nov*. Pouls 78, fort, régulier. Le bubon axillaire est encore dur. Entre en convalescence.

Obs. nº 111. — Augusta Pinto de Mesquita, 14 ans. Entre à l'hôpital le 26 octobre, en état de prostration complète. Facies rouge, conjonctivite. Lèvres sèches. Expression d'étonnement et de souffrance.



Tracé 111.

Bubon inguinal et crural du volume d'une noix, très douloureux, infiltré; peau rouge. Pouls 120, régulier, faible. Respiration calme 32, On injecte 20 c. c. de sérum par voie intraveineuse. 80 c. c. sous la peau en deux fois, matin et soir.

Le 27, état général meilleur. L'état mental permet de recueillir son histoire : était malade depuis le 24 avec céphalalgie intense, douleur à l'aine

gauche. Ne se rappelle rien de ce qui s'est passé jusqu'à son entrée à l'hôpital. Anorexie; conjonctivite; langue saburrale. Pouls 116, dicrote, faible. Respiration 40. Une goutte de sang ensemencée la veille a donné 10 colonies de bacille pesteux. 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 28, pouls 116. Respiration 38. Congestion de la face et des yeux. Bubon très infiltré et douloureux : peau rouge. Insomnie. Rate augmentée de volume. État général meilleur. Cœur : premier temps prolongé ; 2e temps renforcé. Le sang ensemencé le 27 reste stérile. 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 29, un peu de diarrhée. Sommeil calme. Appétit. Pouls 92, faible, régulier. Respiration 36. Bubon œdématié, douloureux. 40 c. c. de sérum sous la peau.

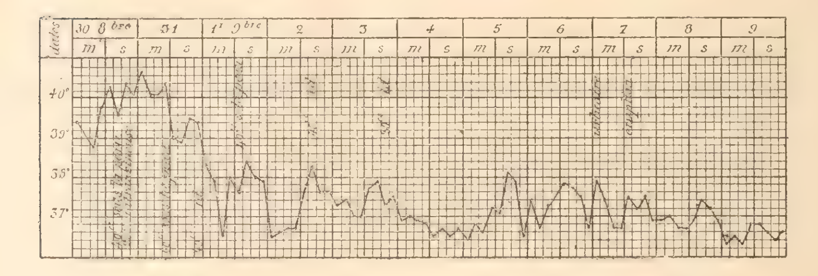
Le 30, bubon encore un peu douloureux et infiltré, diarrhée. Pouls 78.

Le 31, la douleur ganglionnaire a diminué. Pouls 72.

3 *nov.* Le bubon est à peine sensible. Convalescence régulière.

Observation n° 122. — CARMELINA ROSA, 57 ans. Infirmière à l'hôpital de Bonfim.

Entre à l'hôpital le 30 octobre au soir. Malade depuis le 29 avec céphalalgie, frissons, anorexie, faiblesse, vomissements, fièvre.



Tracé 122.

Le 30, matin, prostration profonde. Paralysie du rectum et de la vessie. Respiration faible, plaintive. Cœur : souffle asystolique qui se continue pendant le petit silence. Facies congestionné; 40 c. c. de sérum sous la peau; 20 c. c. intraveineuse.

31 *oct.* Langue sèche, étalée, chargée d'un enduit grisâtre au centre, rouge sur les bords, Lèvres sèches, noirâtres. Pouls 100, petit, vide. Respiration 36.

Prostration profonde.

Ganglion crural à droite un peu infiltré, très douloureux. On injecte 40 c. c. de sérum à midi et 40 c. c. à 9 heures du soir par voie sous-cutanée.

1er *nov.* La malade a repris connaissance. État général meilleur. Douleurs ganglionnaires encore vives. 40 c. c. de sérum sous la peau.

2 *nov.* Pouls 90, plein, régulier. Respiration 26. Le bubon n'est plus dou-

loureux. Insomnie et douleurs vagues dans tout le corps. Un peu d'angine pultacée. 40 c. c. de sérum sous la peau.

3 *nov.* Céphalalgie, insomnie. Le bubon crural est à peine sensible à la pression, bien qu'il ait un peu augmenté de volume. Un ganglion inguinal à droite se montre très douloureux depuis ce matin. Pouls faible, dépressible. Etat général assez satisfaisant. On injecte encore 20 c. c. de sérum.

4 *nov.* L'amélioration continue et la convalescence s'établit sans incident. Pas de suppuration.

Obs. n° 83. — Francisco Salles, 10 ans. Entré le 17 octobre après-midi. Malade depuis le matin. Etat comateux; résolution musculaire complète. Pouls 130, dépressible, vide. Respiration 42. Petits ganglions cervicaux des deux côtés. Engorgement de tous les ganglions des régions inguino-crurales et axillaires, bubon sous-pectoral à droite. Réflexes oculaires presque abolis. Clignotements, tremblements de la mâchoire. Insensibilité complète. Reçoit 40 c. c. de sérum sous la peau et 20 c. c. dans les veines à 4 heures du soir. Deux heures après, le malade ouvre les yeux et reprend connaissance à 9 heures du soir. 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 18, nuit calme. Regard vif. Répond aux questions. Dans la journée délire ambulatoire calme avec hallucinations de l'ouïe. 20 c. c. de sérum sous la peau le matin et 40 c. c. le soir.

Le 19, le délire devient angoissé, toujours ambulatoire, 40 c. c. de sérum l'après-midi; sous la peau.

Dans la soirée, prostration profonde. Douleurs vives à l'abdomen.

Le 20, nuit très agitée. Vomissement le matin : des ascaris lombricoïdes sont expulsés par la bouche. Toujours délire ambulatoire. 40 c. c. de sérum l'après-midi.

Le 21. S'est plaint toute la nuit. Prostration complète avec réveils subits. Meurt le 22 à 5 heures du matin.

Le sang ensemencé le jour de l'entrée avait donné une culture très abondante de peste.

A l'autopsie : Lésions de lymphadénie pesteuse aiguë généralisée. Chaînes ganglionnaires rétro-péritonéales à droite et à gauche de la colonne vertébrale très augmentées de volume, complètement ramollies, laissant échapper à la coupe un liquide chocolat. La cavité péritonéale renferme 200 grammes d'un liquide jaune légèrement trouble, renfermant de nombreux microbes de la peste.

L'ensemencement de tous les organes donne des cultures positives.

Obs. n° 90. — Belouina Conceiçao Ferreira, 7 ans. Entrée à Bonfim le 19 octobre, malade depuis la veille. Frissons, céphalalgie, prostration, insomnie. Tuméfaction et douleur à la région axillaire droite. Reçoit 40 c. c. de sérum sous la peau.

20 *oct.* Congestion de la face. Conjonctivite légère, langue saburrale, pouls 123, fort, régulier. Respiration 38.

Bubon sous-pectoral droit du volume d'un œuf de pigeon ; peau infiltrée un peu rouge. Vives douleurs à la pression.

État général déprimé, expression de souffrance.

Somnolence. Injection de 20 c. c. de sérum dans les veines.

21 *oct.* Sommeil calme, pouls 92, régulier. Bubon douloureux et empâté. État général meilleur. Pas de sérum.

23 *oct.* Amélioration persistante. Bubon toujours douloureux, 20 c. c. de sérum sous la peau.

24 *oct.* Nouvelle injection de 20 c. c. de sérum. La malade tousse un peu. Bubon très dur et douloureux.

26 *oct.* Respiration rude et sibilante. Pas de sérum.

28 *oct.* État général satisfaisant. Appétit. Bubon moins douloureux.

30 *oct.* Le bubon suppure.

31 *oct.* La température s'élève de nouveau à 39°,6.

Pouls à 138, petit. Respiration anxieuse. Le bubon est incisé.

1er *nov.* Dans la matinée, nouveau frisson intense. Respiration accélérée. Pouls 144. Du 1er au 15 nov., oscillation de température entre 38 et 39°,5. Meurt le 15 novembre.

A l'autopsie, on trouve un abcès caséeux dans le poumon gauche, rempli de leucocytes, lesquels étaient bourrés de bacilles pesteux. Lésions de broncho-pneumonie à droite. Assez grande quantité de liquide dans les deux plèvres.

Tous les ganglions voisins du bubon ouvert étaient suppurés. Rate augmentée de volume, marbrée, de couleur d'ardoise. Sous la capsule, un abcès gros comme une noix.

Le sang était stérile. Le suc pulmonaire renfermait de nombreux bacilles de la peste.

Obs. n° 107. — Thereza de Jesus, 14 ans, négresse. Entrée à l'hôpital le 25 octobre.

Malade depuis le 21 soir. Ganglions douloureux et tuméfiés à l'aine droite. Insomnie, soif, anorexie, vomissements. Pouls 115, régulier, plein.

Bubon crural droit, gros comme un œuf de poule, infiltré, douloureux; peau chaude. Bubon pelvien très douloureux, du volume d'une noix. Prostration. Rien au cœur ni aux poumons. Température 39°,2. On injecte 20 c. c. de sérum dans les veines et 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 26, état général meilleur. Encore 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 27, prostration. Bubon crural très diminué, moins sensible. Bubon pelvien encore très douloureux, 40 c. c. de sérum sous la peau.

28 *oct.* Sommeil calme. Bubons très diminués et moins douloureux. Appétit. 45 c. c. de sérum sous la peau.

29 *oct.* Pouls 98, faible, régulier. Pas de sérum.

30 *oct.* Amélioration continue. Les bubons ne sont plus douloureux. Injection de 20 c. c. de sérum parce que la température reste élevée jusqu'à 38°,8.

La convalescence semble s'établir régulièrement.

Tout à coup, vers le 6 novembre, la malade est prise de douleurs abdominales violentes avec diarrhée intense. La température s'élève de nouveau au-dessus de 39° le 8 novembre. État de cachexie. La malade meurt le 14.

A l'autopsie, rien aux poumons ni au cœur.

Rate petite, molle. Dégénérescence amyloïde des deux reins. Congestion et folliculite de l'intestin grêle.

Les ganglions rétro-péritonéaux formaient une vaste masse suppurée. Le bubon fémoro-inguinal était guéri.

Obs. n° 136. — Angelica da Redade, 19 ans. Entrée le 11 novembre.

Malade depuis le 8. Céphalalgie, frissons, vomissements, diarrhée. Prostration. Épistaxis. Anurie. Douleurs dans l'aisselle droite. Bubon axillaire avec œdème rouge. Température 40°,4. Pouls plein, régulier. Facies congestionné.

Le 11, paraît un engorgement ganglionnaire, douloureux, sous le pectoral droit. Douleurs à la région cervicale du même côté où les ganglions sont sensibles. 20 c. c. de sérum dans les veines. 40 c. c. sous la peau.

Le 12, état général assez mauvais. Respiration plaintive. Céphalalgie, soif, diarrhée. Les ganglions cervicaux s'infiltrent. Il se forme un bubon rétro-maxillaire. Empâtement considérable de tout le paquet ganglionnaire de l'aisselle.

Ganglion épithrochléen douloureux au bras gauche. 40 c. c. de sérum sous la peau.

Le 13, congestion de la face, un peu d'exophtalmie, lèvres saillantes, bleues. Pouls 124, régulier. Respiration 44.

Expiration prolongée et murmure vésiculaire diminué dans tout le poumon droit. Les bubons cervicaux et rétro-maxillaires formant une seule masse à droite. Il se forme à gauche un bubon rétro-maxillaire et un bubon sublingual. 20 c. c. de sérum intraveineuse et 40 c. c. sous la peau.

Le 14, état général très mauvais. Epistaxis fréquentes. Pouls 152, flottant. Respiration 44. Bubons doublés de volume.

Le 15, des phlyctènes apparaissent sur le bras gauche, contenant des masses énormes de bacilles pesteux. Morte le 16 au matin.

A l'autopsie, on trouve les bubons énormes, non suppurés. Lésions de lymphadénie généralisée.

Lésions pulmonaires de broncho-alvéolite diffuse. Rate énorme, avec appareils lymphatiques très hypertrophiés. Bubons mésentériques.

Bacilles pesteux dans tous les organes.

Obs. n° 127. — Elvira Rosa da Cunha, 24 ans. Entrée le 4 novembre, malade depuis 8 jours. État très grave. Bubon axillaire et sous-pectoral à droite. Bubon rétro-maxillaire et cervical profond à gauche; 10 c. c. de sérum dans les veines et 40 c. c. sous la peau le soir de son entrée.

A l'auscultation, à gauche, large zone de souffle pneumonique entourée d'une zone de râles crépitants fins. A droite, mêmes signes plus étendus.

L'état s'aggrave. Le 5, nouvelle injection intraveineuse de 20 c. c. et de 40 c. c. de sérum sous la peau. La malade meurt à 11 heures du matin.

A l'autopsie : Pleurésie fibrineuse sur la face latérale externe du poumon gauche au niveau d'un foyer de broncho-pneumonie, de la dimension d'un œuf de poule. A la coupe, ce foyer se présente avec les caractères du stade de l'hépatisation grise, entouré d'une zone noirâtre fortement congestionnée.

Dans le reste du poumon, nodules disséminés de broncho-pneumonie à

divers stades d'hépatisation. Quelques-uns sont déjà en voie de ramollissement et présentent des zones de nécrose à leur centre. Le poumon droit présente les mêmes lésions encore plus accentuées.

Lésions pesteuses ganglionnaires limitées aux bubons déjà décrits. Néphrite parenchymateuse aiguë. Le foie renferme des nodules grisâtres durs, de volumes différents.

Sang stérile. Rate, quelques colonies de microbes de la peste. Bubon, poumons, nodules du foie donnent des cultures abondantes.

Obs. nº 21. — Maria Pinto, 5 ans. Malade depuis le 26 septembre. Entre à l'hôpital le 28. Bubon de l'aisselle droite, délire, pas de bacilles pesteux dans le sang. Symptômes de méningite.

Morte le 30 dans la nuit. A reçu le 28, 20 c. c. de sérum ; le 29, 40 c. c. et le 30, on lui injecte 20 c. c. dans les veines.

A l'autopsie, on constate des lésions de peste ganglionnaire généralisée et des foyers de tuberculose au sommet du poumon droit. Ganglions péribronchiques calcifiés et caséifiés. Tuberculose méningée aiguë localisée sur les ramifications de l'artère sylvienne sous forme de très petits tubercules nucléaires. Épanchements séreux abondants dans toutes les cavités : péritoine, plèvre, péricarde, et augmentation notable du liquide dans les ventricules latéraux.

Obs. nº 31. — Maria dos Santos Costa, 21 ans. Enceinte de sept mois. Malade depuis le 21 septembre, accouche prématurément le 24. Entre à l'hôpital le 2 octobre en état d'adynamie et de résolution musculaire complètes. Pétéchies sur tout le corps. Bubon inguinal à gauche. Engorgement ganglionnaire à droite. Délire. Pouls 126, très petit. Respiration 48. Reçoit le 2, 20 c. c. de sérum dans les veines et 40 c. c. sous la peau. Dix minutes après l'injection intraveineuse, urticaire généralisée qui disparaît quelques heures après. Une goutte de sang ensemencée avant l'injection donne après 24 heures 7 colonies de peste. Dans les lochies, streptocoques et microbes nombreux d'espèces différentes, parmi lesquelles il existe, à l'examen direct, des microbes identiques au bacille pesteux.

Amélioration très passagère. On lui injecte le 3, le 4, le 5 et le 6, 40 c. c. de sérum chaque jour. Le 6 elle reçoit en outre 40 c. c. de sérum antistreptococcique. Le 7 au matin elle tombe dans le coma et meurt à midi avec 42º,5 de température. On n'a pas fait l'autopsie.

*
* *

Nous enregistrons enfin six cas suivis de mort pour compléter l'histoire de tous les insuccès du traitement.

Tous se rapportent à des malades qui ont succombé dans les premières vingt-quatre heures après leur entrée à l'hôpital. Nous croyons inutile de les commenter.

Obs. nº 42. — Candida de Jésus, 11 ans. Malade depuis le 30 septembre. Gardée en observation pendant 5 jours à l'hôpital San Antonio. Entre à

l'hôpital des pestiférés le 5 octobre. Prostration complète. Gros bubon cervical et rétro-maxillaire à droite. Engorgement ganglionnaire à gauche. Au moment de son entrée on lui injecte 10 c. c. de sérum sous la peau. Quatre heures après elle tombe dans le coma et meurt six heures après l'entrée à l'hôpital.

A l'autopsie : Lésions de lymphadénie pesteuse aiguë généralisée. Ecchymoses sous-pleurales des deux côtés. Foyers de broncho-pneumonie dans les deux poumons. Néphrite parenchymateuse aiguë.

Tuméfaction aiguë de la rate avec hypertrophie considérable des appareils lymphatiques. Foyers de dégénérescence graisseuse et de nécrose au foie. Pétéchies sur la muqueuse gastrique.

Les ensemencements faits avec le sang du cœur, la rate, les foyers de broncho-pneumonie et les ganglions donnent d'abondantes cultures de peste.

Obs. n° 59. — Rogerio dos Santos, 11 ans. Observation et autopsie déjà décrite au chapitre des lésions de l'appareil circulatoire.

Lymphadénite aiguë généralisée avec pesticémie. Mort 18 heures après l'entrée à l'hôpital ; a reçu deux injections de 40 c. c. de sérum.

Obs. n° 63. — Manoel Rey Martins, 25 ans. Observation et autopsie résumées dans le chapitre des lésions du système nerveux.

Il s'agissait d'une méningo-encéphalite pesteuse aiguë généralisée. Mort 25 heures après son entrée à l'hôpital. A reçu 80 c. c. en deux fois.

Obs. n° 65. — Joaquim Carlos Texeira, 16 ans. Entré le 11 octobre à 4 heures du soir. Était malade depuis le 10 au soir. Coma. Bubon crural à gauche. Incontinence des selles et de l'urine; une goutte de sang ensemencée à l'entrée donne une culture très abondante de peste.

Meurt 11 heures après l'entrée. A reçu la veille au soir, 10 heures avant la mort, 20 c. c. de sérum par voie intraveineuse.

A l'autopsie, lésions caractéristiques de pesticémie aiguë ; lésions de néphrite interstitielle chronique ; dilatation et hypertrophie du ventricule gauche. Foyers d'artéro-sclérose à l'origine de l'aorte. Culture positive de tous les organes.

Obs. n° 97. — Arnald Pena Garcia, 13 ans. Malade depuis le 18. Entré à l'hôpital le 21 octobre. Prostration complète. Bubon énorme comprenant la région axillaire et sous-pectorale gauche, avec œdème fluctuant. Pouls 122, arythmique, intermittent. Reçoit 40 c. c. de sérum sous la peau. Inspiration âpre. Expiration prolongée.

Meurt le 22 au matin sans avoir repris connaissance.

A l'autopsie : bubon sous-pectoral gauche énorme avec œdème gélatineux très abondant. Lymphadénie généralisée. Myocarde pâle, consistance diminuée ; symphyse complète du poumon gauche ; adhérences des lobes supérieur et moyen à droite. Au sommet du poumon droit, foyer tuberculeux gros comme une noisette. Léger œdème pulmonaire ; néphrite parenchymateuse aiguë.

Le sang ensemencé donne quelques colonies de peste.

Obs. n° 101. — Manoel José Costa, 9 ans. Entré le 23, malade depuis le 22. Prostration profonde. Pouls 138. Respiration difficile, soufflante.

Rien à l'auscultation. Reçoit 20 c. c. de sérum dans les veines, 20 c. c. sous la peau. Le sang renferme de nombreux microbes de la peste. Bubons inguino-cruraux à droite et à gauche. Tous les ganglions légèrement engorgés, sensibles à la pression.

Le 24, même état. Pouls dépressible, 142, 20 c. c. de sérum dans les veines. Inspiration âpre, expiration soufflante. Meurt le 25 dans la soirée.

A l'autopsie : Lymphadénite aiguë généralisée, légère hypertrophie et dilatation du ventricule gauche du cœur.

Poumon gauche ; adhérences anciennes.

Légère congestion et œdème des deux poumons,

Dégénérescence kystique presque complète du rein gauche. La substance corticale est réduite à 5 millimètres environ. Pétéchies sous-capsulaires.

Rein droit : néphrite interstitielle chronique parenchymateuse aiguë.

Le sang ensemencé ne donne que quelques colonies de microbes. Le poumon et les bubons en renferment de très nombreux.

* * *

Les injections intraveineuses de sérum faites dès le début de la maladie, suivies de doses massives sous la peau, également au début, se sont montrées les plus efficaces dans le traitement des formes très graves de peste.

Sur 31 malades traités par cette méthode, présentant tous les symptômes les plus alarmants, nous en avons perdu seulement sept.

Un de ces derniers (cas n° 83) avait été traité dans les premières vingt-quatre heures après le début de la maladie. L'insuccès du traitement dans ce cas est suffisamment justifié par les lésions qu'on a rencontrées à l'autopsie.

Les n°s 90 et 107, chez lesquels le traitement avait été commencé d'assez bonne heure et qui paraissaient guéris, ont succombé, l'un (n° 90) à des complications pulmonaires tardives, l'autre (n° 107) avec un énorme abcès rétro-péritonéal. L'autopsie de ce dernier a été faite après notre départ ; l'examen bactériologique n'a pas été effectué.

Le n° 136, chez lequel le traitement a été commencé le 4e jour de la maladie, a succombé à des complications pulmonaires qui ont débuté le lendemain même de l'entrée à l'hôpital.

Le n° 127 est entré le 8e jour de sa maladie avec une pneumonie très grave, et a succombé 40 heures après.

Les cas n°s 21 et 31 se rapportent à des malades qui avaient en même temps que la peste, l'un une infection puerpérale à streptocoques, l'autre une méningite tuberculeuse.

RECHERCHES SUR LA BACTÉRIOLOGIE DE L'OZÈNE

PAR LE Dr FERNAND PEREZ, DE LA FACULTÉ DE PARIS
Médecin de l'hôpital des Enfants et de l'hôpital français de Buénos-Ayres.

(Travail du laboratoire des éleveurs, dirigé par M. J. Lignières, d'Alfort.)

Loewenberg (1884-94) et Abel (1893) décrivent, sous les noms de *cocco-bacille de l'ozène* et de *bacillus mucosus*, un microorganisme qu'ils trouvent toujours dans le mucus nasal des malades atteints d'ozène.

Ils reconnaissent bien qu'il existe de grandes ressemblances entre ce cocco-bacille, le pneumo-bacille de Friedlander et le *bacillus mucosus :* ce dernier serait une variété du pneumo-bacille. Malgré cela, Abel pense que le nom de *bacillus mucosus* doit être conservé pour indiquer l'origine nasale de ce microbe du groupe du Friedlander.

Nous partageons l'opinion d'Abel. Le microbe qu'il a décrit avec Lœwenberg est une variété du Friedlander, faisant parfois fermenter les solutions sucrées, coagulant le lait plus ou moins vite, ou pas du tout, tout comme les pneumo-bacilles.

Quoi qu'il en soit, pour ces deux auteurs, ce cocco-bacille serait le vrai microbe de l'ozène. Loewenberg ne le trouve que dans cette maladie. Abel aussi le trouve seulement dans l'ozène. Mais pour faire une telle affirmation, il est obligé d'élargir le cadre de l'ozène, altérant sa physionomie clinique si caractéristique. Il en crée une nouvelle forme, l'ozène fruste, sans atrophie, sans fétidité, dans laquelle le nom seul rappelle l'ozène, mais où l'on trouve son *bacillus mucosus*. Jusqu'à Abel, ces cas étaient inscrits sous la rubrique de coryza chronique.

Il soutient aussi que tous les Friedlander décrits dans les voies aériennes supérieures sont des bacilles ozéniques. Pour lui la fétidité des punais serait chose secondaire, et le signe vraiment caractéristique de cette singulière affection serait une

sécrétion filamenteuse, épaisse, visqueuse : caractères qui appartiennent aussi aux cultures en milieux solides de son *bacillus mucosus*, dépourvu, du reste, de toute fétidité.

Quant au bacille pseudo-diphtéritique, considéré par Belfanti et Della Vedova comme l'agent spécifique de l'ozène, nous pensons qu'il ne joue aucun rôle dans cette maladie.

Dans le laboratoire de mon maître M. J. Lignières, qui a bien voulu contrôler toutes mes expériences et dont les conseils éclairés ont grandement facilité ma tâche, j'ai poursuivi une série de recherches bactériologiques sur l'ozène, dont les résultats diffèrent complètement de ceux obtenus par les auteurs cités.

J'ai trouvé dans plusieurs cas d'ozène un microorganisme tout à fait spécial, et qui me paraît être le véritable microbe spécifique de l'ozène. A ma connaissance, ce microorganisme n'a pas encore été étudié. Je le nomme *cocco-bacillus fœtidus ozenæ*.

Voici la technique suivie pour faire les prises dans les fosses nasales et les ensemencements.

Au moyen d'un stylet de platine en forme de spatule, et d'un *spéculum nasi* préalablement flambés, on recueille dans les fosses nasales, surtout vers le méat moyen, un peu de sécrétion avec laquelle on ensemence immédiatement plusieurs tubes de gélose, de gélatine, de sérum-coagulé et de bouillon peptonisé. Le lendemain on procède à leur examen et à l'isolement des différentes espèces microbiennes.

Ce qui frappe tout d'abord, c'est le développement fréquent et très abondant d'un microbe dont la culture est caractérisée par un aspect luisant, muqueux, porcelainé. C'est le microbe décrit par Loewenberg et Abel. Cette culture est toujours parsemée de nombreuses colonies de microbes variés : car l'une des caractéristiques bactériologiques de l'ozène, c'est sa flore microbienne luxuriante, bien plus que celle des autres rhinopathies.

Un autre fait attire l'attention : en enlevant le capuchon de caoutchouc des tubes ensemencés, on observe dans quelques tubes le dégagement d'une odeur fétide particulière.

Elle n'existe que dans les tubes ensemencés avec du mucus ozénique, pas dans tous.

Cette fétidité emmagasinée sous le capuchon a été notre guide et a rendu nos recherches moins difficiles. Tout au début, nous ne fermions pas les tubes de bouillon-peptone. C'était une

faute : ces tubes, nous nous en sommes aperçus ultérieurement, sentent, après agitation, bien plus fort que les tubes de gélose. Les résultats négatifs de certains ensemencements sont peut-être expliqués par ce détail de technique.

Quelquefois l'isolement par la méthode des plaques ne donnait rien, et nous avons été obligé d'avoir recours à l'inoculation intraveineuse, chez le lapin, de cultures impures provenant directement du nez.

D'autres fois, l'odeur caractéristique révélait la présence du microbe dans les cultures : cependant il nous était impossible de l'isoler, soit en employant la méthode des plaques, soit avec l'aide des inoculations : le streptocoque, plus virulent que lui, tuait le sujet et apparaissait seul dans le sang.

L'analyse bactériologique de 63 cas (rhinites diverses 32, ozènes 22, fosses nasales normales 9) constitue la base de ce travail. Presque tous les malades ont été examinés au point de vue clinique dans mon service de l'hôpital des Enfants (otologie, rhinologie et laryngologie) que je dirige depuis 9 ans. En 1886, alors que j'avais l'honneur d'être le chef de clinique de mon maître et ami M. le Dr P. Aysaguer, nous avions déjà fait une étude complète de la symptomatologie de cette affection. Campos Salles fit alors sa thèse sur les indications de Aysaguer. Nous sommes donc habitués à différencier l'ozène des autres affections rhinologiques, et quand nous affirmons le diagnostic de coryza chronique, c'est que, même après avoir constaté la présence du bacille de Loewenberg-Abel, il n'y a pas la moindre trace de la maladie connue sous le nom d'ozène.

Le cocco-bacille Loewenberg-Abel a été trouvé 17 fois sur 22 cas d'ozène.

Il a aussi été mis 7 fois en évidence chez des personnes atteintes de rhinites chroniques, une seule fois chez une fille âgée de 11 ans, et qui était absolument saine. Ajoutons de suite que cette enfant, aussi bien que les 7 autres malades atteints de coryza chronique et âgés respectivement de 2 1/2, 4 1/2, 6, 6 1/2, 7, 16 ans, étaient parents d'ozéneux ou vivaient avec eux.

On peut donc conclure que le *bacillus mucosus* peut exister dans les fosses nasales sans provoquer le tableau clinique de l'ozène type.

On peut dire aussi qu'il n'existe pas dans tous les cas d'ozène,

comme on l'a soutenu, surtout si l'on s'en tient aux caractères des cultures indiqués par Loewenberg (non coagulation du lait).

Notre microbe a été isolé 8 fois seulement sur 22 cas d'ozène. Sur ces 22 cas, 11 étaient des ozènes types avec fétidité. Les 11 autres ne présentaient pas d'odeur.

Parmi les 11 cas de rhinite atrophique fétide, nous avons trouvé le *cocco-bacillus fœtidus ozenæ* 7 fois.

Parmi les 11 qui restent et qui n'avaient pas de fétidité, nous avons isolé notre microbe une seule fois, avec cette particularité que dans les cultures il ne dégageait presque pas d'odeur.

Nous indiquerons sommairement les autres microbes trouvés dans les différents examens : staphylocoque blanc 57 fois, staphylocoque doré 15 fois, pseudo-diphtéritique 27 fois, coli-bacille type 7 fois, micrococcus tetragenus 1 fois, gros bacille prenant le Gram 1 fois, streptocoque 5 fois, levure rouge 1 fois, pyocyanique 5 fois, pneumocoque 5 fois.

Le fait d'avoir trouvé notre microbe dépourvu de fétidité dans un cas de rhinite atrophique sans fétidité présente un très grand intérêt au point de vue pathogénique.

On aurait pu soutenir, en effet, que dans l'ozène les deux microbes avaient un rôle, le *bacillus mucosus* produisant la sécrétion et l'atrophie, la fétidité étant sous la dépendance de l'évolution de notre microorganisme. On peut maintenant écarter toute idée de symbiose.

Le *cocco-bacillus fœtidus ozenæ* serait l'agent spécifique de la maladie, et le Friedlander modifié quelque peu par son séjour dans les fosses nasales jouerait un rôle accessoire : il serait le microbe principal de l'infection secondaire, comme le streptocoque est le parasite secondaire habituel de la scarlatine.

DESCRIPTION DU COCCO-BACILLUS FOETIDUS OZENÆ

Il prend toutes les couleurs d'aniline. Il ne se colore pas par la méthode de Gram.

Dans le mucus ozénique et sur les milieux artificiels, il se présente sous la forme d'un petit cocco-bacille. Sur gélose on observe des formes longues de filaments plus ou moins sinueux.

Il ne présente pas des mouvements de translation. Il est aérobie ou anaérobie facultatif.

Sur une même préparation, on peut observer des formes

bacillaires très longues, de petits bacilles, et la forme en coccus de dimensions variables. Ce polymorphisme pourrait induire en erreur et faire croire à la présence d'espèces diverses, à l'impureté de la culture. Cependant les isolements sur plaques, les cultures en séries et sur divers milieux prouvent qu'il s'agit toujours d'un seul et même microorganisme.

Cultures. — Ce microbe se développe bien, à la température de l'étuve, sur presque tous les milieux de culture. A 20°, il pousse lentement.

Bouillon-peptone. — Au bout de 24 heures, on remarque déjà un dépôt assez abondant, filamenteux. Le liquide qui surnage reste trouble. Ce trouble et ce dépôt augmentent; au bout de 10 jours la culture est véritablement lactescente.

On n'observe pas de voile à la surface. La réaction du milieu ne change pas. Par l'azotite de potasse et l'acide sulfurique, on dévoile la présence de l'indol.

Gélose. — En stries, culture abondante, épaisse, luisante, à bords transparents, finement ondulés, qui n'arrivent jamais à la paroi du tube. En piqûre, à la surface, culture étalée. En plaques, on observe deux sortes de colonies; les unes petites, opaques, se développant à l'abri de l'air; les autres superficielles, bien arrondies, d'abord transparentes, mais devenant rapidement blanchâtres et opaques.

Gélatine. — Mêmes caractères que ceux de la culture en gélose. Elle n'est pas liquéfiée.

Pomme de terre. — C'est un excellent milieu de culture. Au bout de 24 heures, il se forme une couche jaunâtre abondante, humide, sans bulle de gaz.

Infusion de foin. — Milieu de culture assez médiocre.

Sérum coagulé. — Mêmes caractères que sur gélose et sur gélatine : cependant la culture est moins abondante.

Lait. — N'est jamais coagulé : assez souvent il devient alcalin.

Gélose de Wurtz et gélose rubine. — Elles ne virent jamais.

Urine. — *Elle subit la transformation ammoniacale :* le microbe est donc un ferment de l'urée.

Contrairement à l'opinion d'Abel, nous dirons que la fétidité est le symptôme le plus important, le plus caractéristique de la maladie qui nous occupe. On observe, rarement il est vrai, des rhinites atrophiques qui n'ont rien de commun avec le processus

de l'ozène. Dans la syphilis tertiaire des fosses nasales, il existe toujours une sécrétion épaisse et des croûtes. Mais, ce qui ne s'observe que dans l'ozène vrai, c'est une fétidité spéciale, qui permet de faire à coup sûr le diagnostic à distance, qu'on ne saurait confondre avec d'autres odeurs fétides, et qui assombrit, au point de vue social, le pronostic de cette affection. Elle est plus ou moins accentuée : elle peut avoir disparu, mais elle a toujours existé chez tous les ozéneux à un certain moment.

Les cultures de notre cocco-bacille dégagent aussi une fétidité prononcée, spéciale, caractéristique.

Ce n'est pas l'odeur du *coli*, ni l'odeur spéciale du pyocyanique, ni celle de la putréfaction. C'est bien la fétidité de la maladie. Pour bien la percevoir, nous l'avons déjà dit, il est indispensable de capuchonner les tubes. Sa constatation permet d'affirmer la présence du microbe dans un milieu de culture.

Comme la fétidité du punais, celle de notre microbe présente aussi des variations d'intensité et de durée.

Certains cocco-bacilles sentent très fort, d'autres beaucoup moins. Ainsi l'un d'eux, qui fut isolé dans un cas d'ozène sans fétidité, ne dégageait point d'odeur sur gélose et n'en dégageait que très peu en bouillon.

L'intensité de cette odeur dépend aussi du milieu de culture. En bouillon-peptone et gélose, elle est assez forte ; en bouillon pancréatique et en bouillon-sérum, elle est véritablement répugnante. Dans ce dernier milieu elle persiste aussi plus longtemps. Les cultures dans le lait et la gélose de Wurtz, l'infusion de foin, n'ont pas d'odeur.

Un cocco-bacille conservé dans des pipettes fermées pendant six mois et réensemencé était encore fétide en bouillon, presque pas en gélose. Un autre conservé depuis 8 mois, qui avait été retiré du nez depuis un an, n'était plus odorant ni en bouillon-peptone, ni en gelose. Tous les deux, cultivés en bouillon-sérum, dégagèrent une fétidité assez prononcée qui ne dura pas.

Les différents cocco-bacilles que nous avons isolés nous ont donné un fœtor identique. Nous insistons sur cette identité qui constitue un des caractères les plus remarquables de ce microorganisme, et qui, au point de vue de l'étiologie d'une affection saprogène comme l'ozène, présente un intérêt de premier ordre.

Certaines personnes qui vivaient avec des punais ont reconnu

l'odeur de la maladie dans les tubes ensemencés avec ce cocco-bacille. Nous devons dire toutefois que cette odeur peut être tellement intense qu'elle rappelle seulement de loin l'odeur des ozéneux. Il en est de même pour toutes les essences concentrées.

Nous avons ensemencé plusieurs fois notre cocco-bacille dans les fosses nasales des lapins et d'un singe. L'odeur naturelle si pénétrante de ces animaux nous a empêché de sentir la fétidité propre du microbe. Du reste, son développement dans les fosses nasales a été très peu marqué.

INOCULATIONS

Cobayes. — *Inoculation sous-cutanée.* — Il résiste à la dose de 1 c. c. de culture en bouillon-peptone de 24 heures. Si on lui inocule une dilution d'enduit de culture en gélose à la dose de 1/2 c. c. presque toujours aussi il résiste. (Cette dilution se fait avec 1 c. c. de bouillon simple.) Il survient alors un œdème chaud et douloureux qui augmente tous les jours et finit par percer, donnant issue à un pus épais comme du mastic. L'évolution de cet abcès est quelquefois très longue.

Inoculations intra-péritonéales. — Le cobaye résiste presque toujours à une inoculation intra-péritonéale de 1 c. c. de culture en bouillon-peptone. Une culture en bouillon-sérum le tue en trois jours à la dose de 1 c. c.

Avec la dilution de l'enduit de culture sur gélose, la mort survient en 6 heures à la dose de 1 c. c., en 10 heures à la dose de 1/2 c. c.; en douze heures à la dose de 1/4 de c. c.

A l'autopsie on trouve une péritonite très intense avec épanchement hémorragique très abondant. La rate est un peu augmentée de volume. On retrouve le microbe inoculé dans le sang, la rate, le rein et le liquide péritonéal où il se présente quelquefois sous la forme de petits coccus.

Nous devons faire remarquer qu'il ne passe que rarement dans le sang, car les cultures ensemencées avec ce liquide sont assez souvent stériles. Il n'a pas de tendance naturelle à produire une infection générale.

Les autres viscères abdominaux et les poumons sont très congestionnés. On n'observe rien du côté du nez.

Pigeon. — Un pigeon reçoit dans le muscle, le 18 novembre 1898, 1 c. c. de dilution de culture en gélose. Il est malade pendant dix jours. Progressivement l'animal se remet.

Un second pigeon inoculé dans les mêmes conditions meurt en 24 heures. Un troisième pigeon résiste comme le premier.

Rat blanc. — Un de ces animaux, inoculé sous la peau avec 1/2 c. c. d'enduit de gélose dilué, résiste très bien après avoir présenté une réaction locale assez importante.

Souris blanche. — L'inoculation sous-cutanée de 1/4 de c. c. de dilution d'enduit de gélose produit la mort dans les 48 heures. A l'autopsie on trouve : au point d'inoculation un œdème gélatineux, avec des points purulents; la

rate hypertrophiée : congestion des autres viscères abdominaux. On retrouve le microbe inoculé dans le rein et la rate. Le sang reste stérile.

Lapin. — *Inoculation sous-cutanée :* à la dose de 1 c. c. d'une dilution de culture en gélose, voici ce qu'on observe :

Au point d'inoculation apparaît une tumeur chaude, douloureuse, qui devient fluctuante et atteint rapidement le volume d'un œuf de pigeon : un pus crémeux s'en écoule. L'animal survit presque toujours.

Sous la peau de l'oreille, l'inoculation produit des accidents inflammatoires de forme érysipélateuse. Les oreilles peuvent atteindre un volume assez considérable, surtout au niveau des attaches. Cette inflammation se limite bientôt : il se forme plusieurs petits abcès à pus caséeux. La guérison survient par élimination des parties malades.

Inoculation intra-veineuse : aux doses de 1 à 2 c. c. de culture en bouillon-peptone, elle ne produit rien en apparence chez des animaux de taille moyenne.

Si l'on s'adresse à de jeunes animaux, le résultat est un peu différent. Ainsi, nous avons inoculé, il y a deux mois, dans la veine, neuf petits lapins, âgés de 15 à 20 jours, sans les séparer de leur mère. Deux d'entre eux ont reçu 1/4 de c. c. deux autres 1/3 de c. c., et les autres qui restaient 1/2 c. c. d'une culture en bouillon-peptone de 24 heures.

L'un de ceux qui avaient reçu 1/4 de c. c. meurt 9 jours après l'inoculation; un autre qui avait reçu 1/2 c. c. a survécu pendant 13 jours. Tous les autres, après avoir été un peu malades (temp. maxima, 40°,7), sont aujourd'hui bien portants. Ils n'ont rien présenté de spécial du côté des fosses nasales.

Un lapin qui avait reçu dans la veine de l'oreille 1/4 c. c. seulement d'une culture en bouillon-sérum meurt le dixième jour. Voici son histoire clinique :

Il est inoculé le 30 novembre 98. La température monte rapidement ; l'animal est triste; respiration haletante. Perte de l'appétit. Le troisième jour de l'inoculation, il survient par les deux narines une *sécrétion muco-purulente, épaisse, jaune-verdâtre,* tellement abondante qu'elle recouvre bientôt presque toute la poitrine de l'animal. La maigreur devient très grande. Il meurt dans la nuit du 10 au 11 décembre 1898.

Nous reproduisons le tableau de sa température :

		matin	soir
1	décembre	39°1′	40°2′
2	—		39°9′
3	—	40°2′	40°
4	—	40°2′	—
5	—	40°5′	40°9′
6	—	40°5′	40°8′
7	—	40°7′	40°9′
8	—	40°9′	41°2′
9	—	40°6′	40°4′
10	—	39°8′	39°6′
11	—	mort.	

Autopsie. — Rate énorme. Péricardite avec exsudat, congestion pulmonaire. Trachée congestionnée, ecchymotique par places. Aux orifices des fosses nasales on remarque une sécrétion extrêmement abondante, jaunâtre. La pituitaire est très congestionnée, et recouverte de mucosités épaisses et filantes.

Les cultures faites avec du mucus donnent le microbe inoculé avec toutes ses réactions.

Nous appelons l'attention, dès maintenant, sur l'apparition de ce jetage si abondant, et sur les lésions inflammatoires que présente la muqueuse pituitaire.

Il est exceptionnel qu'une dose de 1/4 c. c. d'une culture en bouillon-sérum produise une réaction aussi intense du côté de la pituitaire. En général, l'animal survit même avec des doses de 1 c. c.

A la dose de 2 c. c., l'inoculation d'une culture en bouillon-sérum est presque toujours mortelle dans un délai qui varie entre 48 heures et 15 jours.

Exemple. — Le 9 février 99, six lapins furent inoculés dans la veine marginale avec 2 c. c. de culture en bouillon-sérum.

Quatre d'entre eux moururent en 25 heures avec forte fièvre et jetage très peu abondant. Un autre résista pendant cinq jours ; il avait une sécrétion nasale assez abondante, les deux oreilles étaient œdémateuses et recouvertes de phlyctènes.

Un seul de ces six lapins survécut. Son histoire clinique est remarquable et présente un très grand intérêt.

Cet animal fut très atteint par l'inoculation. Forte fièvre, prostration, perte complète de l'appétit. Le lendemain déjà le nez commença à couler. Ce jetage nasal muco-purulent augmenta rapidement au point de devenir remarquablement abondant. Il persista pendant quinze jours. L'animal était d'une maigreur extrême, presque cachectique : la mort paraissait imminente. A notre grande surprise, une amélioration commença à se manifester ; l'appétit revint. Un mois après, le lapin mangeait comme s'il était absolument sain, sans perdre cependant cet aspect cachectique des jours passés. En même temps nous observâmes du côté des oreilles des phénomènes très intéressants. Les deux pavillons étaient œdémateux, énormes, chauds, douloureux. Au niveau des bords apparurent des taches livides, bleuâtres, qui devinrent noirâtres froides, et prirent l'aspect de tissus nécrotiques. Après l'élimination des parties atteintes, les bords des pavillons présentaient de grandes encoches. (Voir fig. 1 et 2). Nous faisons remarquer que ces lésions des oreilles sont bilatérales, bien que l'inoculation ait été faite d'un seul côté.

Quatre mois après, ce lapin semblait tout à fait rétabli ; un nouvel accident se produisit alors. Sur le dos du nez, presque au niveau de la pointe, on vit apparaître une petite saillie qui augmenta jusqu'à acquérir le volume d'une noisette. (Voir fig. 1 et 2). Il s'agissait d'un abcès froid, dont l'évolution dura un mois. Le pus blanc très épais, recueilli purement, donna une culture presque pure du *cocco-bacillus fetidus ozenæ* : ceci se passait cinq mois après l'inoculation, sans retentissement apparent du côté de la santé générale.

Le 15 août de cette année, cet animal est sacrifié.

Autopsie. — Au niveau de l'abcès le périoste est épaissi, et l'on remarque une fistule, à travers laquelle on peut introduire un stylet qui apparaît dans la fosse nasale au-dessus du cornet antérieur.



Fig. 1.



Fig. 2.

Après avoir fait une coupe médiane antéro-postérieure du crâne et de la face, on peut constater l'existence de la lésion anatomo-pathologique qui caractérise l'ozène. Chez ce lapin, en effet, *les cornets antérieurs et postérieurs sont manifestement plus petits qu'à l'état normal, surtout du côté droit.*

On peut se rendre compte de cette lésion en examinant la fig. 3. On y trouve reproduites, pour servir de terme de comparaison, deux autres coupes semblables (1 et 2), l'une d'un lapin absolument sain, et l'autre d'un lapin

inoculé avec 1 c. c. de culture en bouillon-sérum, qui ne fut pas malade et qui ne présenta aucune réaction du côté de la pituitaire; chez les deux, les cornets ont les dimensions normales.

Dans les nombreux examens des fosses nasales de lapins que nous avons



Fig. 3

pratiqués, nous n'avons *jamais observé cette exiguïté des cornets.* L'atrophie est donc indéniable.

L'inoculation intraveineuse de l'enduit de culture en gélose diluée est presque toujours mortelle dans un délai variable, mais assez court.

Exemple. — Un lapin inoculé dans la veine avec 1/4 c. c. meurt en 24 heures. Après l'inoculation l'animal devient triste, il perd l'appétit, la température s'élève et la respiration s'accélère. En même temps apparait à l'orifice des narines *une sécrétion purulente, hémorragique quelquefois, très*

abondante, qui finit par boucher les orifices des fosses nasales. L'animal se cyanose : la région du dos du nez devient œdémateuse. Ces signes et ces symptômes sont surtout prononcés avec la dose de 1/2 c. c.

Autopsie. — Il n'y a qu'une légère hypertrophie de la rate. La lésion principale, je dirai presque unique, se montre au niveau des fosses nasales où l'on trouve les restes d'une violente inflammation. La muqueuse est très hyperhémiée et recouverte de mucosités dont la culture donne le microbe inoculé.

Dans certains cas, cette congestion de la pituitaire est si rapide qu'elle apparait 8 à 10 heures après l'inoculation, et si prononcée que l'animal présente du tirage, au point qu'on peut entendre sa respiration à distance.

D'autres fois cette inoculation produit une maladie de plus longue durée.

Exemple. — Le 7 janvier, un lapin reçoit dans la veine 1/2 c. c. de dilution d'une culture en gélose. Le lendemain, symptômes généraux très prononcés.

Température :	7 janv.	—	40°,6 s.
	8 »	—	39°,3 s.
	9 »	36°,5 m.	38°,2 s.
	10 »	37°,6 m.	37°,2 s.

Écoulement nasal abondant, épais, jaune verdâtre.

L'animal est mourant depuis deux jours. Il ne mange rien : les oreilles sont œdémateuses, énormes, tombantes : il reste tout le temps couché sur le flanc. Nous le sacrifions pour qu'il ne devienne pas la proie des vers.

Autopsie. — Rate petite : poumons normaux.

Les orifices des fosses nasales sont remplis de mucosités hémorragiques. La poitrine est tachée par le muco-pus. A l'ouverture des fosses nasales les cornets sont complètement recouverts de muco-pus.

Le 7 février de cette année, j'inocule six lapins dans la veine avec 1/2 c. c. de la dilution de culture en gélose. L'un d'eux meurt en 18 heures, avec jetage nasal très abondant; trois périssent en 36 heures; un autre résiste pendant huit jours, avec des oreillles gangrenées en partie.

De ces six lapins un seul a survécu. Il présente au niveau des oreilles des altérations vraiment curieuses. La période aiguë passe assez vite, au bout de 5 à 6 jours; mais l'animal reste très amaigri, et immobile. On croit qu'il va bientôt mourir. Peu de jours après l'inoculation, le bout des deux oreilles s'incurve, et présente l'aspect d'un pétale qui commence à s'étioler. Si on les touche, elles sont froides, livides; elles ont une coloration bleuâtre, et commencent à sécher, à se recroqueviller. Cette zone devient noirâtre et dure comme du carton.

Cette lésion se limite : on sent très bien une ligne d'élimination assez régulière, légèrement épaisse, qui sépare très nettement les parties saines des parties nécrosées. Ces lésions sont symétriques. Un mois après l'inoculation, la partie nécrosée tombe spontanément et l'animal amaigri, cachectique, présente un aspect très curieux avec ses deux oreilles comme coupées en travers aux ciseaux.

Le 12 avril, c'est-à-dire deux mois après le début de son infection,

cet animal meurt avec une paralysie du train postérieur qui avait commencé quinze jours avant.

Autopsie. — La rate est petite. On trouve les lésions d'une cysto-pyélonéphrite sûrement d'origine trophique. Dans le nez, rien de spécial.

A l'examen microscopique on trouve une grande quantité de globules rouges et de leucocytes. Cellules pavimenteuses : cristaux d'oxalate de chaux.

Le 23 février, je recommence l'expérience avec six autres lapins, exactement dans les mêmes conditions. Trois d'entre eux meurent le lendemain avec *sécrétion nasale purulente et hémorragique :* un autre meurt le 26, avec très peu d'écoulement. Le 1er mars meurt le cinquième, *sécrétion nasale abondante*, amaigrissement, petites plaques de gangrène sèche au niveau des oreilles. Le sixième résiste et présente, comme dans l'expérience précédente, une gangrène sèche, symétrique des extrémités des oreilles.

Singe. — Pendant quinze jours nous avons pratiqué des inoculations intra-nasales à un jeune singe à l'aide d'une spatule de platine chargée d'enduit d'une culture en gélose. Avec la spatule nous produisions en même temps une irritation préalable mécanique de la pituitaire. Certains jours l'animal présentait une sécrétion nasale. Il commença à maigrir, ne tarda pas à devenir cachectique et mourut deux mois après.

Autopsie. — Rien aux poumons : organes abdominaux normaux. Dans les fosses nasales on ne remarque rien de spécial.

Avant les inoculations, nous avons examiné la flore bactérienne des fosses nasales de ce singe : il avait du coli-bacille type, du staphylocoque *albus* et *aureus*.

Nous résumerons ainsi qu'il suit les principaux caractères du *coco-bacillus fetidus ozenæ*.

Il est immobile, ne prend pas le Gram, ne liquéfie pas la gélatine, ne fait pas fermenter les solutions lactosées, ne coagule jamais le lait. Il fait de l'indol ; c'est un ferment de l'urée. Il est pathogène pour le cobaye, la souris, le pigeon et le lapin. Presque toutes ses cultures dégagent une odeur fétide caractéristique.

L'infection qu'il produit chez le lapin peut être aiguë, subaiguë ou chronique. Dans ces trois formes, au début de l'infection, le cocco-bacille, dont la virulence n'est pas très grande, provoque presque toujours une sécrétion nasale très intense, hémorragique quelquefois, bien différente des jetages consécutifs à l'inoculation de microbes virulents. Il a donc une action élective indéniable sur la muqueuse pituitaire.

A l'autopsie des animaux morts à la suite de l'inoculation intraveineuse, ce qui frappe surtout c'est l'absence de lésions généralisées des septicémies hémorragiques : la rate est légè-

rement hypertrophiée ; les poumons sont presque toujours sains, quelquefois ils présentent un peu de congestion : deux fois seulement, dans nos nombreuses autopsies, nous avons trouvé des foyers de pneumonie. La lésion principale, presque unique, est située sur la muqueuse pituitaire, qui est très hyperhémiée, souvent véritablement hémorragique et recouverte de mucosités épaisses *où l'on retrouve le microbe inoculé.*

Nous appelons aussi l'attention sur ces lésions bilatérales et symétriques si curieuses des pavillons de l'oreille. Dans les formes chroniques, les lapins inoculés ont un aspect chétif, misérable, et présentent pendant longtemps une maigreur extrême, malgré le retour de l'appétit. Il en est de même chez les ozéneux, qui sont en général faibles, maigres et anémiques.

Il nous a été donné de reproduire expérimentalement chez le lapin l'atrophie qui caractérise, depuis Zaufal, l'ozène vraie.

L'identité presque absolue du pneumo-bacille et du cocco-bacille de Loewenberg-Abel nous dispense d'établir un parallèle entre ces microbes et notre *cocco-bacillus fetidus ozenæ*

Le *bacillus mucosus* est complètement dépourvu de fétidité, il n'a aucune action spéciale élective sur la pituitaire. Sa spécificité ne peut être acceptée.

De par ces constatations, et en nous basant sur les résultats fournis par l'expérimentation, nous sommes donc en droit d'affirmer que le *cocco-bacillus fetidus ozenæ* est bien le microbe spécifique de la rhinite atrophique fétide.

P.-S. Dans le dernier numéro des *Annales de Laryngologie*, nous avons eu l'occasion de lire un long travail de M. Cozzolino, de Naples, sur la bactériologie de l'ozène.

D'après cet auteur, le *bacillus-mucosus* serait pathogène à la dose de 1 c. c. de culture en bouillon-peptone, et ses cultures dégageraient une odeur nauséabonde. Ces résultats si différents de ceux auxquels étaient arrivés Loewenberg et Abel, et dont l'exactitude a été vérifiée par nos recherches, ne peuvent s'expliquer que par l'impureté des cultures de M. Cozzolino.

Buenos-Ayres, 30 août 1899.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

TRAVAUX ORIGINAUX

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

N° 1. — 25 Janvier 1899.

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 1

VIENT DE PARAITRE :

E. Duclaux. **Traité de microbiologie**. Tome II, contenant l'étude des *Diastases, toxines et venins.* 1 vol. grand in-8° de IV-768 pages, avec figures dans le texte. Paris, Masson et Cie. 15 francs.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE

PROFESSEUR A LA SORBONNE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

N° 2. — 25 Février 1899.

PARIS

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 2

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

N° 3. — 25 Mars 1899.

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 3

Les **Archives d'Anatomie microscopique** *paraissent par fascicules d'environ 150 pages accompagnées de figures dans le texte et de planches en noir et en couleurs.*

Quatre fascicules, paraissant à des époques indéterminées, forment un volume.

On s'abonne pour un volume :

Paris et départements. **36** fr. | Union postale........ **38** fr.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

N° 4. — 25 Avril 1899.

PARIS
MASSON ET C[ie], ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 4

Les **Archives d'Anatomie microscopique** *paraissent par fascicules d'environ 150 pages accompagnées de figures dans le texte et de planches en noir et en couleurs.*

Quatre fascicules, paraissant à des époques indéterminées, forment un volume.

On s'abonne pour un volume :

Paris et départements. **36** fr. | Union postale........ **38** fr.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

N° 5. — 25 Mai 1899.

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 5

Les **Archives d'Anatomie microscopique** *paraissent par fascicules d'environ 150 pages accompagnées de figures dans le texte et de planches en noir et en couleurs.*

Quatre fascicules, paraissant à des époques indéterminées, forment un volume.

On s'abonne pour un volume :

Paris et départements. **36** fr. | Union postale........ **38** fr.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX
MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

N° 6. — 25 Juin 1899.

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 6

Recherches expérimentales sur le mécanisme de la cicatrisation des plaies de la cornée, par L. Ranvier (Pl. VII, VII *bis*, VIII). — Influence histogénétique d'une forme antérieure, à propos de la régénération de la membrane de Descemet; — Mécanisme histologique de la cicatrisation; de la réunion immédiate vraie; — Réunion immédiate synoptique.

Recherches sur le développement embryonnaire de quelques Chrysomélides, par A. Lécaillon (Pl. IX). — V. Évolution de l'ectoderme; — VI. Évolution du mésoderme; — VII. Considérations générales.

Recherches sur le développement du cœur, des premiers vaisseaux et du sang chez les Amphibiens modèles (Triton Alpestris), par le Dr A. Brachet, assistant à l'Université de Liège (Pl. X, XI, XII).

Sur quelques formations particulières de la cavité générale des Ophélies, par J. Kunstler, professeur adjoint, et A. Gruvel, chargé de cours à la Faculté de médecine de Bordeaux (Pl. XIII, XIV).

Recherches histologiques sur la structure des corps vertébraux des Poissons téléostéens, par P. Stéphan (Pl. XV).

Sur quelques éléments des ganglions optiques chez les Décapodes, par Ém. Radl.

Sur le développement de la cellule-mère du sac embryonnaire des Liliacées et en particulier sur l'évolution des formations ergastoplasmiques, par M. Bouin, préparateur, et P. Bouin, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Nancy (Pl. XVII, XVIII).

Le développement du pollen et la réduction chromatique dans le Najas major, par L. Guignard (Pl. XIX, XX). — I. Formation et multiplication des cellules-mères primordiales; — II. Division des cellules-mères définitives et formation des grains de pollen; — III. Formation des cellules génératrices ou gamètes mâles; — IV. Considérations générales.

Histologie de la peau, par L. Ranvier (Pl. XXI). — I. La matière grasse de la couche cornée de l'épiderme chez l'Homme et les Mammifères; — II. La graisse épidermique des Oiseaux.

Études sur l'action des sels sur les Infusoires, par E.-G. Balbiani (Pl. XXII). — Introduction; — Première partie. De notre méthode de culture des Infusoires et de l'action des sels considérée au dehors de l'accoutumance.

Les **Archives d'Anatomie microscopique** *paraissent par fascicules d'environ 150 pages accompagnées de figures dans le texte et de planches en noir et en couleurs.*

Quatre fascicules, paraissant à des époques indéterminées, forment un volume.

On s'abonne pour un volume :

Paris et départements. **36** fr. | Union postale........ **38** fr.

Sceaux — Imprimerie E. Charaire

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE

PROFESSEUR A LA SORBONNE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

N° 7. — 25 Juillet 1899.

PARIS

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 7

Les **Archives d'Anatomie microscopique** *paraissent par fascicules d'environ 150 pages accompagnées de figures dans le texte et de planches en noir et en couleurs.*

Quatre fascicules, paraissant à des époques indéterminées, forment un volume.

On s'abonne pour un volume :

Paris et départements. **36** fr. | Union postale........ **38** fr.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de MM.

N° 8. — 25 Août 1899.

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 8

OUVRAGES REÇUS :

M. Arthus. — **La coagulation du sang.**

H. Bordier. — **Les actions moléculaires dans l'organisme**, 2 volumes de la collection *Scientia*. Paris, G. Carré et C. Naud.

Recherches expérimentales sur le mécanisme de la cicatrisation des plaies de la cornée, par L. Ranvier (Pl. VII, VII *bis*, VIII). — Influence histogénétique d'une forme antérieure, à propos de la regénération de la membrane de Descemet; — Mécanisme histologique de la cicatrisation; de la réunion immédiate vraie; — Réunion immédiate synoptique.

Recherches sur le développement embryonnaire de quelques Chrysomelides, par A. Lécaillon (Pl. IX). — V. Évolution de l'ectoderme; — VI. Évolution du mésoderme; — VII. Considérations générales.

Recherches sur le développement du cœur, des premiers vaisseaux et du sang chez les Amphibiens modèles (Triton Alpestris), par le Dr A. Bracher, assistant à l'Université de Liège (Pl. X, XI, XII).

Sur quelques formations particulières de la cavité générale des Ophélies, par J. Kunstler, professeur adjoint, et A. Gruvel, chargé de cours à la Faculté de médecine de Bordeaux (Pl. XIII, XIV).

Recherches histologiques sur la structure des corps vertébraux des Poissons téléostéens, par P. Stéphan (Pl. XV).

Sur quelques éléments des ganglions optiques chez les Décapodes, par Em. Radl.

Sur le développement de la cellule-mère du sac embryonnaire des Liliacées et en particulier sur l'évolution des formations ergastoplasmiques, par M. Bouin, préparateur, et P. Bouin, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Nancy (Pl. XVII, XVIII).

Le développement du pollen et la réduction chromatique dans le Najas major, par L. Guignard (Pl. XIX, XX). — I. Formation et multiplication des cellules-mères primordiales; — II. Division des cellules-mères définitives et formation des grains de pollen; — III. Formation des cellules génératrices ou gamètes mâles; — IV. Considérations générales.

Histologie de la peau, par L. Ranvier (Pl. XXI). — I. La matière grasse de la couche cornée de l'épiderme chez l'Homme et les Mammifères; — II. La graisse épidermique des Oiseaux.

Études sur l'action des sels sur les Infusoires, par E.-G. Balbiani (Pl. XXII). — Introduction; — Première partie. De notre méthode de culture des Infusoires et de l'action des sels considérée au dehors de l'accoutumance.

Les **Archives d'Anatomie microscopique** *paraissent par fascicules d'environ 150 pages accompagnées de figures dans le texte et de planches en noir et en couleurs.*

Quatre fascicules, paraissant à des époques indéterminées, forment un volume.

On s'abonne pour un volume :

Paris et départements. **36** fr. | Union postale........ **38** fr.

Sceaux — Imprimerie E. Charaire.

Treizième Année. Tomo XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX
MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Assisté d'un Comité de rédaction composé de MM.

N° 9. — 25 Septembre 1899.

PARIS
MASSON ET C[ie], ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 9

OUVRAGES REÇUS :

M. ARTHUS. — **La coagulation du sang.**

H. BORDIER. — **Les actions moléculaires dans l'organisme**, 2 volumes de la collection *Scientia*. Paris, G. CARRÉ et C. NAUD.

Les **Archives d'Anatomie microscopique** *paraissent par fascicules d'environ 150 pages accompagnées de figures dans le texte et de planches en noir et en couleurs.*

Quatre fascicules, paraissant à des époques indéterminées, forment un volume.

On s'abonne pour un volume :

Paris et départements. **36** fr. | Union postale........ **38** fr.

Sceaux — Imprimerie E. Charaire.

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

No 10. — 25 Octobre 1899.

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 10

Recherches expérimentales sur le mécanisme de la cicatrisation des plaies de la cornée, par L. Ranvier (Pl. VII, VII *bis*, VIII). — Influence histogénétique d'une forme antérieure, à propos de la régénération de la membrane de Descemet ; — Mécanisme histologique de la cicatrisation ; de la réunion immédiate vraie ; — Réunion immédiate synoptique.

Recherches sur le développement embryonnaire de quelques Chrysomélides, par A. Lécaillon (Pl. IX). — V. Évolution de l'ectoderme ; — VI. Évolution du mésoderme ; — VII. Considérations générales.

Recherches sur le développement du cœur, des premiers vaisseaux et du sang chez les Amphibiens modèles (Triton Alpestris), par le Dr A. Brachet, assistant à l'Université de Liège (Pl. X, XI, XII).

Sur quelques formations particulières de la cavité générale des Ophélies, par J. Kunstler, professeur adjoint, et A. Gruvel, chargé de cours à la Faculté de médecine de Bordeaux (Pl. XIII, XIV).

Recherches histologiques sur la structure des corps vertébraux des Poissons téléostéens, par P. Stéphan (Pl. XV).

Sur quelques éléments des ganglions optiques chez les Decapodes, par [illegible]

Sur le développement de la cellule-mère du sac embryonnaire des Liliacées et en particulier sur l'évolution des formations ergastoplasmiques, par M. Bouin, préparateur, et P. Bouin, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Nancy (Pl. XVII, XVIII).

Le développement du pollen et la réduction chromatique dans le Najas major, par L. Guignard (Pl. XIX, XX). — I. Formation et multiplication des cellules-mères primordiales ; — II. Division des cellules mères définitives et formation des grains de pollen ; — III. Formation des cellules génératrices ou gamètes mâles ; — IV. Considérations générales.

Histologie de la peau, par L. Ranvier (Pl. XXI). — I. La matière grasse de la couche cornée de l'épiderme chez l'Homme et les Mammifères ; — II. La graisse épidermique des Oiseaux.

Études sur l'action des sels sur les Infusoires, par E.-G. Balbiani (Pl. XXIII). — Introduction ; — Première partie. De notre méthode de culture des Infusoires et de l'action des sels considérée au dehors de l'accoutumance.

Les **Archives d'Anatomie microscopique** *paraissent par fascicules d'environ 150 pages accompagnés de figures dans le texte et de planches en noir et en couleurs.*

Quatre fascicules, paraissant à des époques indéterminées, forment un volume.

On s'abonne pour un volume :

Paris et départements. **36** fr. | Union postale........ **38** fr.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

N° 11. — 25 Novembre 1899.

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur forment tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 11

Recherches expérimentales sur le mécanisme de la cicatrisation des plaies de la cornée, par L. RANVIER (Pl. VII, VII *bis*, VIII). — Influence histogénétique d'une forme antérieure, à propos de la régénération de la membrane de Descemet ; — Mécanisme histologique de la cicatrisation ; de la réunion immédiate vraie ; — Réunion immédiate synoptique.

Recherches sur le développement embryonnaire de quelques Chrysomelides, par A. LÉCAILLON (Pl. IX). — V. Évolution de l'ectoderme ; — VI. Évolution du mésoderme ; — VII. Considérations générales.

Recherches sur le développement du cœur, des premiers vaisseaux et du sang chez les Amphibiens modèles (Triton Alpestris), par le Dr A. BRACHET, assistant à l'Université de Liège (Pl. X, XI, XII).

Sur quelques formations particulières de la cavité générale des Ophélies, par J. KUNSTLER, professeur adjoint, et A. GRUVEL, chargé de cours à la Faculté de médecine de Bordeaux (Pl. XIII, XIV).

Recherches histologiques sur la structure des corps vertébraux des Poissons téléostéens, par P. STÉPHAN (Pl. XV).

Sur quelques éléments des ganglions optiques chez les Décapodes, par EM. RADL.

Sur le développement de la cellule-mère du sac embryonnaire des Liliacées et en particulier sur l'évolution des formations ergastoplasmiques, par M. BOUIN, préparateur, et P. BOUIN, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Nancy (Pl. XVII, XVIII).

Le développement du pollen et la réduction chromatique dans le Najas major, par L. GUIGNARD (Pl. XIX, XX). — I. Formation et multiplication des cellules-mères primordiales ; — II. Division des cellules-mères définitives et formation des grains de pollen ; — III. Formation des cellules génératrices ou gamètes mâles ; — IV. Considérations générales.

Histologie de la peau, par L. RANVIER (Pl. XXI). — I. La matière grasse de la couche cornée de l'épiderme chez l'Homme et les Mammifères ; — II. La graisse épidermique des Oiseaux.

Études sur l'action des sels sur les Infusoires, par E.-G. BALBIANI (Pl. XXII). — Introduction ; — Première partie. De notre méthode de culture des Infusoires et de l'action des sels considérée au dehors de l'accoutumance.

Les **Archives d'Anatomie microscopique** *paraissent par fascicules d'environ 150 pages accompagnées de figures dans le texte et de planches en noir et en couleurs.*

Quatre fascicules, paraissant à des époques indéterminées, forment un volume.

On s'abonne pour un volume :

Paris et départements. **36** fr. | Union postale........ **38** fr.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

Treizième Année. Tome XIII.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE M. PASTEUR

ET PUBLIÉES PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT DE FRANCE
PROFESSEUR A LA SORBONNE
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

Nº 12 — 25 Décembre 1899.

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain.

Les Annales de l'Institut Pasteur *forment* tous les ans un volume de 8 à 900 pages, et paraissent le 25 de chaque mois.
Prix de l'abonnement : Paris : 18 francs. — Départements et union postale : 20 francs.

SOMMAIRE DU N° 12

OUVRAGES REÇUS :

Dr Le Roy. **Thérapeutique, clinique et bactériologie de l'appareil respiratoire**, avec 12 figures hors texte. Paris, Rueff.

Charabot, Dupont et Pillet. **Les huiles essentielles et leurs principaux constituants**. Un vol. grand in-8° de 1000 p. Paris, Ch. Béranger.

J. Canabal. **Estadistica sanitaria del Uruguay**. Montevideo, 1899.

MASSON ET C[ie], ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120

L'ŒUVRE MÉDICO-CHIRURGICAL

D[r] CRITZMAN, Directeur.

N° 20.

Vient de paraître :

LA PESTE

ÉPIDÉMIOLOGIE, BACTÉRIOLOGIE, PROPHYLAXIE

PAR

Le D[r] H. BOURGES

Chef du laboratoire d'Hygiène à la Faculté de médecine de Paris
Auditeur au Comité consultatif d'Hygiène publique de France.

1 *brochure grand in-8°, avec figures dans le texte* . . . . . **1 25.**

DERNIÈRES MONOGRAPHIES PUBLIÉES

N° 11. **Les Paralysies générales progressives**, par M. le D[r] Klippel, médecin des hôpitaux de Paris.

N° 12. **Le Myxœdème**, par le D[r] G. Thibierge, médecin de la Pitié.

N° 13. **La Néphrite des Saturnins**, par le D[r] H. Lavrand, professeur à la Faculté catholique de Lille.

N° 14. **Traitement de la syphilis**, par E. Gaucher, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, médecin de l'hôpital Saint-Antoine.

N° 15. **Le Pronostic des Tumeurs**, *basé sur la recherche du glycogène*, par le D[r] A. Brault, médecin de l'hôpital Tenon, chef des travaux pratiques d'anatomie pathologique à la Faculté.

N° 16. **La Kinesithérapie gynécologique**. *Traitement des maladies des femmes par le massage et la gymnastique (système de Brandt)*, par H. Stapfer, ancien chef de clinique obstétricale et gynécologique de la Faculté de Paris.

N° 17. **De la Gastro-entérite aiguë des nourrissons** (*Pathogénie et étiologie*), par A. Lesage, médecin des hôpitaux de Paris.

N° 18. **Traitement de l'Appendicite**, par Félix Legueu, professeur agrégé à la Faculté de médecine de Paris, chirurgien des hôpitaux.

N° 19. **Les Lois de l'énergétique dans le régime du diabète sucré**, par le D[r] E. Dufourt, ancien chef de clinique médicale à la Faculté de Lyon, médecin de l'hôpital thermal de Vichy.

Il est accepté des Abonnements pour une série de 10 *Monographies au prix à forfait et payable d'avance de* 10 *fr. pour la France et* 12 *fr. pour l'étranger (port compris).*

Chaque Monographie est vendue séparément 1 fr. 25.

Sceaux. — Imprimerie E. Charaire.

